

André Luiz de Almeida Melo

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS NATIVOS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner E APLICAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO *Aedes aegypti* Linnaeus (DIPTERA: CULICIDAE), *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E *Panagrellus redivivus* Goodey (NEMATODA: RHABDITIDA)**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

Curitiba

2013

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Carlos Ricardo Soccol, meu orientador, que sempre acreditou no potencial dos bioinseticidas, das bactérias e meu. Sua visão privilegiada e exemplo de aplicação ao trabalho serviram de guia durante o doutorado. Obrigado e sempre serei grato.

À incansável professora Doutora Vanete Thomaz Soccol, minha co-orientadora, que me acompanha desde a graduação e que até hoje não se cansa de ensinar esse seu aluno meio sequelado. Meus sinceros agradecimentos por tudo que aprendi nesses anos de convívio.

À Leim Kou de Almeida Melo, minha mãe, que sempre me apoiou e deu força nessa longa jornada. Já a fiz passar por poucas e boas, mas, como ela mesmo diz, no final dá tudo certo. Obrigado, mãe!

À professora Dra. Luciana P.S. Vandenberghe, que mesmo coordenando a pós-graduação ainda tem tempo e paciência para ajudar um aluno em fermentação semissólida. Seu esforço beneficia todos, obrigado!

Aos colegas, funcionários e professores do departamento de Engenharia de Bioprocessos, às vezes fazer ciência parece excentricidade no país do futebol. É um alívio quando vemos que há outras pessoas conosco contrariando essa regra. Obrigado e "vamos pra frente".

Às professoras Edilene A. de Castro, Rosângela C. Paulino, Magda C. Ribeiro, Maria Aparecida Zawadneak, que até hoje me hospedam e me fazem sentir em casa mesmo no frio e úmido prédio de Ciências Biológicas.

À Universidade Federal do Paraná, que investe na minha formação há muitos anos de várias formas e cuja lembrança e retribuição levarei sempre comigo pela vida profissional.

À Capes, pelo suporte financeiro com a bolsa durante o período de doutorado.

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	ii
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>01</b>
Referências Bibliográficas.....	04
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>06</b>
1. PRODUÇÃO E ANÁLISE DOS BIOINSETICIDAS.....	06
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	06
1.2. Substratos Utilizados.....	07
1.2.1. Cama de frango.....	07
1.2.2. Bagaço de mandioca.....	08
1.2.3. Polpa cítrica.....	08
1.3. <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (RAPD).....	09
1.4. SDS-PAGE.....	09
2. INVERTEBRADOS AVALIADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	10
2.1. Filo NEMATODA.....	10
2.1.1. <i>Panagrellus redivivus</i> (Goodey).....	11
2.2. Ordem DIPTERA.....	12
2.2.1. <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus).....	12
2.3. Ordem LEPIDOPTERA.....	14
2.3.1. <i>Duponchelia fovealis</i> (Zeller).....	15
Referências Bibliográficas.....	16
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>20</b>
Evolução e distribuição da dengue no estado do Paraná, Brasil, em 2009-2012	
Introdução.....	20
Métodos.....	22
Resultados.....	23
Discussão.....	27
Referências Bibliográficas.....	31

<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>33</b>
Toxicidade dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle biológico de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus), <i>Duponchelia fovealis</i> (Zeller) e <i>Panagrellus redivivus</i> (Goodey) e estudo do polimorfismo	
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	35
Resultados.....	39
Discussão.....	45
Conclusão.....	48
Referências Bibliográficas.....	49
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>52</b>
Utilização da cama de frango em meio de cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> Berliner para o controle de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus	
Introdução.....	53
Materiais e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	57
Conclusão.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>63</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i> : mecanismo de ação, resistência e novas aplicações	
Introdução.....	64
Mecanismo de ação do <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	65
Resistência .....	69
Outras aplicações do <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	74
Conclusões.....	81
Referências Bibliográficas.....	81
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>89</b>
Referências Bibliográficas.....	91
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1: Incidência da dengue no Paraná nas 22 Regionais de Saúde nos três períodos estudados (A- 2009-2010, B-2010-2011 e C- 2011-2012).....26

Figura 2: Casos autóctones de dengue e formas graves da doença (FHD e DCC) no período de 2009-2012 no estado do Paraná, Brasil.....27

### Capítulo 2

Figura 1: Mortalidade de *A. aegypti* conforme a concentração do fermentando de *B. thuringiensis*, cepa BR-01.....41

Figura 2: Mortalidade de lagartas de *D. fovealis* conforme a concentração do fermentado de *B. thuringiensis* produzido com a cepa BR-09.....42

Figura 3: Perfil protéico por SDS-PAGE dos biopesticidas produzidos por BR-09, BR-04, BR-12, BR-01 e IPS-82.....43

Figura 4: Exemplo de perfil de bandas polimórficas do *B. thuringiensis* amplificadas com o primer RAPD-18 em gel de agarose 1,2%.....44

Figura 5: Géis das amplificações aleatórias por RAPD produzido com os primers RAPD-01, RAPD-10, RAPD-16, RAPD-25, RAPD-27 e RAPD-28.....44

Figura 6: Dendrograma relacionando as 16 cepas de *B. thuringiensis* de acordo com coeficiente de similaridade de Jaccard dos produtos das amplificações de RAPD.....46

### Capítulo 3

Figura 1: Porcentagem de mortalidade de larvas L3 de *Aedes aegypti* produzida pelas diferentes formulações do bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner (Bti) após 24 horas.....58

## Capítulo 4

Figura 1: Mecanismo de ação da toxina Cry de Bt, modelo de ligação sequencial. A- Toxina Cry (Tx) se liga a receptores caderina (Cd) na membrana plasmática; B- Ligação do Cry com receptores N-aminopeptidase (N-a); C- Clivagem proteolítica da proteína por oligomerização (Ol); D- Formação do pré-poro e ancoramento na membrana; E- Poros (P) afetando integridade da membrana.....66

Figura 2: Mecanismo de ação da toxina Cry do Bt, modelo de via de sinalização: A- Toxina Cry (Tx) se ligando a receptores caderina (Cd) na membrana plasmática; B- Estímulo à apoptose (Ap) com ativação de canais iônicos (ci) na membrana plasmática; C- Entrada de íons magnésio culminando na morte celular.....68

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Casos autóctones, importados e incidência (100.000 habitantes), por Regional de Saúde (1 <sup>a</sup> a 22 <sup>a</sup> ) nos períodos epidêmicos (2009-2010, 2010-2011 e 2011-2012), no estado do Paraná.....	24
--	----

### Capítulo 2

Tabela 1: Porcentagem de mortalidade das três espécies com as cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	40
--	----

Tabela 2: Dose letal (DL <sub>50</sub> ) do extrato fermentado de duas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra o nematóide de vida-livre <i>Panagrellus redivivus</i> após 24 horas. DL <sub>50</sub> estimada usando Trimmed Spearman-Kärber.....	42
--	----

Tabela 3: <i>Primers</i> decâmeros polimórficos (SADDER et al., 2005) e o correspondendo número de fragmentos amplificados.....	44
---	----

Tabela 4: Coeficiente de Similaridade Genética de Jaccard dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> por RAPD.....	47
---	----

### Capítulo 3

Tabela 1: Composição química da cama de frango.....	58
---	----

### Capítulo 4

Tabela 1: Estratégias dos organismos resistentes para tolerar a presença da toxina Cry de inseticidas biológicos de Bt e cultivares geneticamente modificados .....	70
---	----

Tabela 2: Tipos de parasporinas conhecidas, suas atividades biológicas e a referência.....	78
--	----

## RESUMO

As pragas possuem uma relação desarmônica com a espécie humana, seja atentando contra sua integridade ou limitando a produção de algum recurso. Em saúde pública, as pragas representam um grupo de organismos que são responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos a espécie humana. Por muito anos, o controle de pragas era realizado com a utilização de inseticidas químicos que na época obtiveram elevada eficiência. Contudo, com o passar do tempo essas formulações sintéticas se mostraram ambientalmente danosas. Além disso, observou-se o surgimento de resistência por parte desses insetos, reduzindo significativamente a eficiência dos pesticidas. Desde então, a pesquisa por formas alternativas de controle tem se intensificado priorizando produtos com alta especificidade ao organismo alvo, baixo potencial residual e não apresentar efeito cumulativo na cadeia trófica. Nesse contexto, a utilização de formulações produzidas a partir de bactérias produtoras de endotoxina, como *Bacillus thuringiensis*, se mostrou promissora e viável. No estado do Paraná, o desenvolvimento dos bioinseticidas possuiu uma aplicabilidade promissora na economia, tendo em vista a importância da agricultura e na saúde pública, com o crescente número de casos de dengue observados na última década. No intervalo de 2009 a 2012, o período de 2009 a 2010 apresentou o mais elevado número de casos de dengue, com 32.456, resultando em uma incidência de 308,8 casos / 100.000 habitantes. Esses valores determinaram o estado como área de alta incidência de dengue naquele período. No estudo com os isolados nativos de *Bacillus thuringiensis* utilizando a técnica de RAPD, observou-se uma grande variabilidade molecular entre as cepas, que alcançaram índices de similaridade genética bastante variáveis. Os testes biológicos contra três organismos-alvo pertencentes a ordens distintas, revelou diferentes graus de toxicidade de *B. thuringiensis*. Nos bioensaios com *Aedes aegypti*, a maior toxicidade foi obtida com a cepa BR-01, que alcançou 95% de mortalidade na maior concentração testada, resultado que superou o obtido com a cepa padrão da bactéria. Contra *Panagrellus redivivus*, observou-se os maiores índices de mortalidade com as cepas BR-04 e BR-12, que alcançaram 70% e 95%, respectivamente. Nos testes com *Duponchelia fovealis*, as maiores mortalidades foram obtidas com a cepa BR-09, que atingiu 90% na maior concentração do fermentado. Os testes com diferentes substratos para a produção de *B. thuringiensis*, revelaram o maior potencial da cama de frango para a formulação de meios de cultivo para a bactéria. Utilizado a um taxa de 4% nos meios de cultivo, esse substrato propiciou uma maior toxicidade a *A. aegypti* com a cepa BR-01 do que as formulações produzidos com bagaço de mandioca e polpa cítrica. A proporção de 4:1 das taxas de carbono e nitrogênio provavelmente influenciou na diferença de toxicidade observada. Embora os produtos de Bt sejam utilizados há décadas pelo homem, os mecanismos de ação entomopatogênica não foram completamente desvendados. Pesquisas recentes têm apontado para diferentes formas de ação, como a formação de poros na membrana plasmática e acionamento da apoptose. Da mesma forma, a resistência dos invertebrados aos produtos de Bt e cultivares transgênicos também apresentam diferentes estratégias. Além disso, novas aplicações da bactéria estão sendo desenvolvidas, como produção de quitinases e pesquisas por substâncias anti-tumorais.

**Palavras-chave:** dengue, *Culicidae*, *Nematoda*, *Lepidoptera*, cama de frango, quitinases, câncer.



## ABSTRACT

Plague organisms have a disharmonious relationship with the human species, is attempting against his integrity or limiting the production of a resource to man. In public health pests represent a group of organisms which are responsible for transmission of pathogens to humans. For many years, the pest control was accomplished with the use of chemical insecticides that obtained high efficiency. However, over time these synthetic formulations have proved environmentally harmful. Also, we observed the emergence of resistance by these insects, reducing significantly the efficiency of pesticides. Since then, the search for alternative forms of control has intensified, prioritizing products with high specificity to the target organism, low residual potential in the environment and has no cumulative effect on the food chain. In this context, the use of the formulations made from endotoxin producing bacteria such as *Bacillus thuringiensis*, showed promising and feasible. In Paraná state, the development of biopesticides owned a promising applicability in the economy, as the importance of agriculture in the state, and public health, with the increasing number of dengue cases observed in the last decade. In the interval from 2009 to 2012, the period from 2009 to 2010 had the highest number of cases of the disease, with 32,456, resulting in an incidence of 308.8 cases of the disease / 100,000 inhabitants. These values determined the state as an area of high incidence of dengue in that period. In the study with the native *Bacillus thuringiensis* isolates using RAPD, there was a large molecular variability between strains, which reached levels of genetic similarity rather variable. The biological tests against three target organisms from different orders, revealed varying degrees of toxicity depending on the strain of *B. thuringiensis*. The bioassays with *Aedes aegypti*, the greater toxicity was observed with strain BR-01, which 95% mortality at the highest concentration tested exceeded the result obtained with the standard strain of bacteria. Against *Panagrellus redivivus*, we observed the highest mortality rates with strains BR-04 and BR-12, which reached 70% and 95%, respectively. In tests with *Duponchelia fovealis*, the highest mortality was obtained with strain BR-09, which reached 90% at the highest concentration of fermented product. Tests using different substrates for production of *B. thuringiensis*, showed the greatest potential of poultry litter to the formulation of culture media for bacteria. Used at a 4% rate in the culture media, this substrate led to greater toxicity to *A. aegypti* with strain BR-01 than the formulations produced with cassava bagasse and citrus pulp. The 4:1 ratio of the rates of carbon and nitrogen probably influence the toxicity observed. Although Bt products are used by humans for decades, the mechanisms of entomopathogenic action have not been fully unraveled. Recent research has pointed to different forms of action, such as the formation of pores in the plasma membrane and activation of apoptosis. Likewise, the resistance of invertebrate Bt products and transgenic crops also have different strategies. In addition, new applications of bacteria are being developed, such as chitinase production and research for anti-tumor substances.

**Keywords:** dengue, Culicidae, Nematoda, Lepidoptera, poultry litter, chitinases, cancer.

## INTRODUÇÃO GERAL

O conceito ecológico de pragas inclui os organismos que apresentam relação desarmônica e prejudicial aos interesses humanos. Sendo assim, quando sua densidade aumenta a níveis elevados costuma afetar negativamente o homem, causando dano a sua integridade ou reduzindo a qualidade de um recurso por ele utilizado (ART, 1998). Tal fenômeno pode ocorrer de forma direta, quando a ação do organismo afeta à integridade, ou indiretamente, quando o homem é afetado secundariamente, com a limitação da produção de alimento, por exemplo (BRECHELT, 2004).

Na saúde pública, a designação de praga é usada para insetos vetores transmissores de agentes patogênicos. Na agricultura e pecuária, as pragas são constituídas por diversas espécies de invertebrados, cujas ações reduzem a produção vegetal nas lavouras e a massa verde de pastagens, quer seja pela ação de formas adultas ou larvárias desses organismos (PEIXOTO et al., 1994; VIEIRA et al., 2010). Embora a preocupação com o meio ambiente e a qualidade dos alimentos privilegiem formas alternativas e menos poluentes de controle de pragas, nos dias de hoje a forma mais comum de combate desses organismos é a utilização de agrotóxicos.

Apesar do combate de pragas ter sido foco de interesse desde a antiguidade, somente na década de 40 os programas de controle alcançaram sucesso significativo, com a descoberta do DDT, resultando num elevado incrementando da produção agrícola (HOBELINK, 1990). Viveu-se a chamada Revolução Verde, com a aplicação de agrotóxicos em abundância aumentando a capacidade produtiva das lavouras, além de eliminar vetores invertebrados e extinguindo-se doenças. Apesar do sucesso inicial, com o passar do tempo o uso indiscriminado dessas substâncias se mostrou extremamente nocivas ao homem e ao meio ambiente. Concomitantemente, verificou-se a resistência dos organismos a esses compostos sintéticos, indicando que as estratégias de combate precisavam ser revistas (SOBREIRA & ADISSI, 2003).

Nesse contexto, iniciaram-se pesquisas por formas alternativas e menos danosas de controle de pragas. As bactérias produtoras de endotoxina demonstraram ter grande potencial de aplicação, proporcionando eficiência na eliminação de diversas pragas e maior segurança ao meio ambiente. Apresentam

elevada especificidade ao organismo alvo, os produtos derivados desses Bacilli não são cumulativos na cadeia trófica, além de inócuos ao homem e outros animais (BRAVO et al., 2011).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram positiva, de crescimento aeróbico, conhecida por apresentar elevadas propriedades larvicidas e ser inócua para organismos vertebrados. Existem diversas formulações disponíveis no mercado nacional para o combate de várias espécies de invertebrados, oferecendo segurança e baixo potencial residual (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Amplamente usado na agricultura e frequentemente na saúde pública, os produtos a base de Bt podem ser encontrados em diferentes formulações dependendo do uso. Podem ter formulações líquida ou granulada, adaptada à estratégia de aplicação. Além da eficiência comprovada, a utilização dos bioinseticidas oferece a garantia de um produto livre de agrotóxicos, agregando valor devido à qualidade, como ocorre com os alimentos orgânicos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2009).

O mecanismo de ação dos inseticidas de Bt está associado à endotoxina produzida durante a esporulação da bactéria. Uma vez disponível no ambiente e ingerido pelo organismo alvo, o pH alcalino do trato digestivo ativa os cristais que se fragmentam e dão origem às proteínas Cry. Interações moleculares entre esses peptídeos e os receptores no epitélio digestivo desencadeiam resposta citopática irreversível, forma poros nas membranas celulares e leva à morte em poucas horas (POLANCZYK & ALVES, 2003). A especificidade com o receptor é um dos fatores que garantem a eficiência em baixas doses do produto e a segurança ambiental dos produtos derivados de Bt (BRAVO et al., 2007).

O isolamento de cepas de *B. thuringiensis* pode ser obtido especialmente a partir de amostras de solo ou cadáveres de invertebrados, documentado em diversos trabalhos pelo mundo (BRAVO et al., 2011). Em ambos os casos, técnicas envolvendo o crescimento em meios seletivos, análise morfológica e verificação da forma geométrica da endotoxina podem ser suficientes para a identificação da espécie do micro-organismo (PRAÇA et al., 2004). Sendo assim, diversos isolados de *B. thuringiensis* se encontram armazenados e disponíveis em laboratórios, porém frequentemente com poucas informações genéticas ou de toxicidade.

O estudo e a compreensão das características das cepas de *B. thuringiensis* podem ser extremamente úteis para a utilização e elaboração dos bioinseticidas. Para tanto, a utilização de ferramentas moleculares que discriminem os micro-

organismos tem ocorrido com sucesso, auxiliando na otimização dos inseticidas biológicos. Diversas técnicas moleculares possibilitam a obtenção de informações genéticas e, dentre elas, a amplificação aleatória por RAPD é considerada de fácil execução, rápida e de baixo custo. A técnica ainda permite o estudo de organismos selvagens ainda não descritos ou sequenciados, além de produzir resultados confiáveis que auxiliam no estudo dos polimorfismos (KUMAR et al., 2010).

Quanto à ação citopática, embora a especificidade ao organismo alvo seja a característica típica dos produtos de Bt, as inúmeras cepas disponíveis podem conferir atividade biológica frente a diversas espécies de invertebrados potencialmente susceptíveis, atuando de maneira exclusiva. Originadas sob influência do polimorfismo bacteriano, as proteínas Cry podem apresentar atividade biológica em culicídeos, nematóides, lepidópteros ou coleópteros (MOREAU & BAUCE, 2001). A indicação da cepa bacteriana para o controle do organismo alvo depende principalmente de ensaios *in vivo*, quando o micro-organismo tem a eficiência de mortalidade aferida através de testes padronizados que simulam o esperado em campo.

Sobre o cultivo e multiplicação do Bt, apesar do elevado potencial entomopatogênico e nematicida da endotoxina, a bactéria não possui complexas exigências metabólicas, necessitando apenas de fontes usuais de carbono e nitrogênio (SARRAFZADEH, 2012). Entretanto, a escolha da composição do meio de cultivo é de suma importância na produção do bioinseticida, pois dele dependerá a viabilidade econômica de sua produção. O meio padrão para o micro-organismo é composto por substâncias sintéticas de alto valor agregado, elevando excessivamente o custo final do produto, sendo um obstáculo para a fermentação em larga escala. Sendo assim, a pesquisa por matérias-primas de baixo custo tem sido um desafio na produção dos inseticidas biológicos de Bt.

Embora os produtos derivados de *B. thuringiensis* sejam utilizados há décadas, sejam na forma de inseticidas biológicos ou genes inseridos aos cultivares para torná-los resistentes a pragas, os mecanismos de ação sobre os organismos alvo permanecem pouco conhecidos. Da mesma forma, as estratégias de resistência desenvolvida por determinadas espécies invertebradas ainda não foram inteiramente elucidadas. Simultaneamente a essas lacunas no conhecimento sobre a bactéria, novas aplicações começaram a ser desenvolvidas recentemente, como a produção de quitinases e pesquisa por substâncias anti-câncer.

O presente trabalho enfocou os citados pontos referentes ao uso dos biopesticidas de *Bacillus thuringiensis* redigidos na forma de artigos e compilados em capítulos. A incidência da dengue no estado do Paraná e consequente pertinência da aplicação local dos inseticidas de Bt na saúde pública foram abordado no primeiro, em um manuscrito submetido ao periódico Epidemiologia e Controle de Infecção. No segundo capítulo, a utilização dos isolados nativos de Bt foi testada contra larvas de *Aedes aegypti*, lagartas de *Duponchelia fovealis* e nematóides de *Panagrellus redivivus*, tendo o resultado de toxicidade comparado com o estudo molecular do polimorfismo pela técnica de RAPD. O terceiro capítulo abordou a produção do bioinseticida utilizando subprodutos e resíduos agroindustriais, como a cama de frango, o bagaço de mandioca e a polpa cítrica, em um artigo submetido ao periódico Journal of Biotechnology and Biodiversity. Finalmente o quarto capítulo foi constituído de uma revisão que abordou as recentes descobertas no mecanismo de ação e resistência ao Bt, além das novas utilizações potenciais da bactéria, como a produção de quitinases e pesquisa por substâncias anti-câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ART W.H. Dicionário de ecologia e ciências ambientais. São Paulo: UNESP/Melhoramentos, 1998.
- BRAVO A., GILL S.S. & SOBERÓN M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4) : 423-435, 2007.
- BRAVO A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S. S. & SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423-431. 2011.
- BRECHLT A.O. Manejo Ecológico de Pragas e Doenças. Santa Cruz do Sul, República Dominicana: Fundação Agricultura e Meio Ambiente (FAMA), Rede de Ação em Praguicidas e suas Alternativas para a América Latina (RAP-AL), 2004.
- CONSOLI R.A.G.B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ J.L., VALDEZ-CEPEDA R.D., SERVÍN-VILLEGAS R., MURILLO-AMADOR B., RUEDA-PUENTE E.O., SALAZAR-SOSA E., VÁZQUES-VÁSQUEZ C. & TROYO-DIÉGUEZ E. Pest management in organic vegetable production. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 15–29, 2009.
- HOBELINK H. Biotecnologia muito além da revolução verde. Porto Alegre : Riocell, 1990.

KUMAR D., CHAUDHARY K. & BOORA K.S. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. Indian J Microbiol 50:27-32, 2010.

MOREAU G. & BAUCE E. Developmental polymorphism: a major factor for understanding sublethal effects of *Bacillus thuringiensis*. Entomol Exp Appl 98(2): 133-140, 2001.

PEIXOTO A.Z., MOURA J.C., FARIA V.B. Pastagens: fundamentos da exploração racional. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1994.

POLANCZYK R. & ALVES S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. Agrociência, Montevideu 7:1-10, 2003.

PRAÇA L.B., BATISTA A.C., MARTINS E.S., SIQUEIRA C.B., DIAS D.G.S., GOMES A.C.M.M., FALCÃO R. & MONNERAT R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39(1): 11-16, 2004.

SARRAFZADEH, M. H. Nutritional Requirements of *Bacillus thuringiensis* During Different Phases of Growth, Sporulation and Germination Evaluated by Plackett-Burman Method. Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Note Vol, 31(4), 2012.

SOBREIRA A.E.G. & ADISSI P.J. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. Ciência e Saúde Coletiva 8(4): 985-990, 2003.

VIEIRA E.L., SOUZA G.S., SANTOS A.R. & SILVA J.S. Manual de Fisiologia Vegetal São Luís, MA: EDUFMA, 2010.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Produção e análise dos bioinseticidas

#### 1.1. *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram positiva, aeróbica facultativa e produtora de cristal protéico (BRAVO et al., 2011). Isolada inicialmente no Japão, teve suas propriedades larvicidas descritas nos primeiros trabalhos no início do século XX, chegando posteriormente ao ocidente. O primeiro uso do micro-organismo no continente foi para o combate de *Ostrinia nubilalis* (Hubner), inseto da ordem Lepidoptera cuja lagarta é praga do milho, que estimulou o desenvolvimento dos primeiros produtos com a bactéria ainda na década de 30, na França (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992). Atualmente, a bactéria é o principal micro-organismo utilizado no controle biológico, sendo aplicado para o controle de diversos organismos e pragas com importância agrícola e na saúde pública, nas mais variadas formulações adaptadas aos diversos organismos alvos (FEDERICI et al., 2010).

O mecanismo de ação do *B. thuringiensis* é desencadeado pela ação das endotoxinas bacterianas Cry, Cyt e Vip, sendo a primeira delas a mais eficiente no controle de invertebrados. Atualmente essa proteína é produzida industrialmente e usada em formulações comerciais aplicadas nas lavouras e adicionado às plantas geneticamente modificadas. Sintetizados e excretados durante a esporulação, esses cristais bi-piramidais atingem o meio ambiente podendo permanecer estáveis por vários meses (ARONSON, 2002). Após a ingestão, os cristais são ativados no trato digestório do organismo em pH alcalino e enzimas proteolíticas, se fragmentam dando origem às proteínas Cry. Na hipótese tradicional, os peptídeos apresentariam receptores específicos na membrana plasmática que desencadeia a formação de poros nas células da epiderme do trato do organismo, levando a célula a um desequilíbrio osmótico e consequente morte celular (BRAVO et al., 2007).

Mais recentemente, alguns trabalhos têm questionado a formação de poros na patogenicidade do Bt, apontando o aumento do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular como um fator determinante na letalidade (VACHON et al., 2012, MONETTE et al., 1997). Independente a esse fato, a reação irreversível culminando na lise celular e morte do organismo em poucas horas. Existem descritos mais de 50 variantes polimórficas da

proteína Cry, cada uma delas com modificações na composição e estruturas espaciais que conferem afinidades a diferentes espécies de invertebrados. Dessa forma, dependendo da proteína Cry do *B. thuringiensis* obtêm-se diferentes taxas de mortalidade contra diferentes organismos alvo (BRAVO et al., 2013).

Outro mecanismo de toxicidade do Bt é consequência da produção de enzimas quitinases (SAMPSON & GOODAY, 1998). Mais recentemente estudadas, essas enzimas estão relacionadas à degradação na quitina que recobre o exoesqueleto de insetos e nematóides, principais organismos afetados pelo Bt. As quitinases são produzidas em grande quantidade por *B. thuringiensis* e atuam de forma sinérgica aos cristais protéicos, incrementando os valores de toxicidade (LIU et al., 2002). A importância das quitinases na toxicidade foi exemplificada por VU et al. (2009), que mesmo aplicando concentrações inferiores de esporos e cristais em relação ao grupo controle, obtiveram incremento na toxicidade com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Os produtos derivados de Bt apresentam diversas vantagens em relação aos inseticidas sintéticos. Não poluentes e biodegradáveis, os compostos de origem bacteriana são ambientalmente seguros, com reduzido poder residual, não se acumulando no ambiente (KUMAR et al., 2000). Além disso, os biopesticidas de *B. thuringiensis* são extremamente específicos ao organismo alvo, oferecendo segurança aos demais e não influenciando na cadeia trófica. Em relação ao homem e demais vertebrados, os compostos de *B. thuringiensis* são inócuos, vantagem considerável frente aos pesticidas químicos de elevada toxicidade aos organismos não alvo e poder residual contaminante ao ambiente (SIEGEL, 2001).

## 1.2. Substratos testados

### 1.2.1. Cama de frango

Cama de frango é a denominação dada ao composto de cepilho e serragem utilizado para cobrir os galpões evitando o contato direto com o chão dando maior conforto às aves. Permanecendo por um longo período como substrato para os animais, o material tem sua constituição enriquecida pela matéria orgânica oriunda das excretas e fezes das aves, tornando o resíduo rico em compostos nitrogenados



(HERNANDEZ et al., 2002). No Brasil, até o ano de 2001 esse material era reaproveitado como para adubação de pastagens e alimentação animal, porém, uma normativa do Ministério da Agricultura proibiu essa utilização como prevenção da encefalopatia espongiforme bovina (BRASIL, 2001). Além disso, logo em seguida trabalhos registrando casos de botulismo em bovinos pela ingestão da cama de frango indicaram o risco em empregar o resíduo para tal finalidade (DUTRA et al. 2005, LOBATO et al., 2008). Desde o ano de 2010, no Brasil a produção de carne de frango tem ultrapassado a cifra de 12 toneladas, o que indica uma produção de cama de frango ainda maior, tendo em vista que estima-se que um frango produz durante a vida aproximadamente 2,19 kg de cama de frango (SANTOS & LUCAS Jr, 2004).

#### 1.2.2. Bagaço de mandioca

O bagaço de mandioca é um subproduto do processamento da raiz da mandioca, um vegetal energético de baixo custo com cultura amplamente distribuída no Brasil (RAMOS et al. 2000). Entre os diversos produtos fabricados a partir da raiz, a fabricação do polvilho é um dos que possui maior valor agregado, sendo de grande interesse para a indústria alimentícia. Durante o seu processamento, forma-se o bagaço de mandioca, um composto considerado como fonte de carboidratos rapidamente fermentável. Sua composição química pode conter teores de até 60% de amido, que o credencia para a composição de meios para cultivo para o crescimento bacteriano (RAUPP et al. 1999).

#### 1.2.3. Polpa cítrica

A polpa cítrica é um subproduto da indústria citrícola de elevada aplicação na criação de animais, principalmente bovinos e aves. Sua aplicação na alimentação deve-se ao alto teor de matéria seca, carboidratos solúveis e capacidade de armazenar água (RODRIGUES et al. 2005). Constituindo um composto de alta densidade energética, é indicado como suplemento para animais em fase de crescimento e lactação, adicionado a taxas de 10% ao volume de ração. Outra vantagem na utilização do resíduo é não apresentar qualquer efeito negativo sobre a fermentação ruminal, como os alimentos ricos em amido (HENRIQUE et al. 2003).

Apesar da rica composição desse resíduo, a polpa cítrica é pouco estudada como matéria prima de meios de cultivo e fermentações bacterianas.

### 1.3. *R*andom Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

A técnica de RAPD (*R*andom Amplification of Polymorphic DNA) é uma variante da reação em cadeia da polimerase que amplifica segmentos aleatórios de DNA. Diferentemente da reação de PCR original, o RAPD utiliza apenas um único iniciador, sendo esse mais curto, com 8-12 nucleotídeos. Como consequência, a ligação com a fita molde ocorre por diversas vezes em diferentes regiões, de forma aleatória (HADRYN et al., 1992).

O teste utiliza amostras de DNA genômico de organismos não sequenciados possibilitando a comparação prévia, mesmo sem o conhecimento das sequências de bases, formando o chamado “finger print” característico a cada táxon ao qual o organismo faz parte (STEWART JR & VIA, 1993). Normalmente, os padrões de bandas obtidos indicam maior proximidade genética e molecular entre os isolados testados, dados que são quantificados e calculados através de metodologias matemáticas.

A análise do resultado é feita através da interpretação do gel com as amostras submetidas à eletroforese. As informações de presença e ausência de bandas são usadas na construção de uma tabela binária, cujas informações são usadas no cálculo do índice de Jaccard. De posse desses valores, o programa constrói um dendrograma com essas informações que irá representar graficamente esses valores e taxas de similaridade entre os caracteres analisados. Quanto maior o número de primers utilizados, maior o poder de discriminação entre as amostras de DNA testadas. O RAPD é usado para caracterizar e estudar a filogenia entre os organismos (LYNCH & MILLIGAN, 1994).

### 1.4. SDS-PAGE

O SDS-PAGE consiste em um tipo de eletroforese em que as amostras são desnaturadas pelo calor na presença de substâncias desnaturantes (beta-mercaptoetanol) que destrói as pontes dissulfeto, e SDS para desnaturar a proteína agindo ainda na separação das cadeias polipeptídicas isoladas (LAEMMLI, 1970).

Muito empregada em trabalhos de bioquímica, genética, biologia molecular e biotecnologia, a técnica apresenta aplicação no estudo das proteínas Cry presentes em *B. thuringiensis*, diferenciando-as primariamente através de suas propriedades físicas, antecedendo o emprego de testes moleculares (BRAVO et al., 1998).

A execução se inicia com a reação da amostra com o detergente aniônico do dodecil-sulfato de sódio, que é realizado em alta temperatura. Nessas condições, ocorrerá a linearização das proteínas contidas na amostra, distribuindo uniformemente as cargas elétricas entre os peptídeos, anulando a diferença de cargas elétricas das proteínas testadas. Após essa etapa, o material é submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida, que fraciona os peptídeos da amostra de acordo com o tamanho da molécula (GUPTA & SHEPHERD, 1990).

## 2. INVERTEBRADOS AVALIADOS NO TRABALHO

### 2.1. Filo NEMATODA

Nematoda compreendem um grupo de organismos invertebrados, vermiformes, não segmentados com simetria bilateral. O corpo é envolvido por uma cutícula que confere proteção e permite movimento devido à flexibilidade e ação dos músculos longitudinais (BIRD & BIRD, 1991). Os nematóides podem apresentar formas de vida livre, se alimentando de micro-organismos ou restos de matéria orgânica, ou ser fitopatogênicos e zooparasitas. Em geral são animais dióicos, porém em muitos casos os machos não são conhecidos, reproduzindo-se por partenogênese (RUPPERT & BARNES, 1996).

Além do impacto na saúde pública humana, os nematóides zooparasitas apresentam importância econômica na produção animal. Sua presença resulta em diminuição da produtividade e ganho de peso, tendo sua incidência constantemente monitorada e controlada. Em bovinos, registram-se a ocorrência de aproximadamente 50 espécies de nematóides, habitando principalmente trato digestório e fígado, que afetam negativamente a produção de carne e leite. Em ovinos e caprinos, são conhecidas em torno de 40 espécies, preferencialmente no trato digestório e respiratório, geram mortes e perdas econômicas. Em equinos, aproximadamente 60 espécies de nematóides geram prejuízos afetando

predominantemente trato digestivo e sangue. Da mesma forma, criações de frangos e perus são afetadas por aproximadamente 60 espécies desses organismos (TAYLOR et al., 2010).

De uma forma geral, a contaminação de nematóides aos animais ocorre com a ingestão ou penetração da larva L3 no hospedeiro. Além de espoliar o animal, a presença dos nematóides desencadeia respostas que podem ser sintomáticas ou assintomáticas (REY, 2007). A primeira delas é a lesão causada durante a penetração, da larva L3, que pode fazer uso de enzimas proteolíticas causando respostas ao hospedeiro. Uma vez instalado, a presença do verme pode afetar o metabolismo pela obstrução mecânica de vasos sanguíneos, causando obstruções que reduzem o fluxo sanguíneo causando desordens metabólicas por isquemia (COURA, 2013). Outra consequência pode ser o desequilíbrio osmótico. Além disso, principalmente em lesões crônicas, ocorre desenvolvimento da resposta imune adaptativa, formando anti-corpos e causando necrose ou apoptose no tecido afetado. Nesses casos, é comum observar-se a formação de reações granulomatosos a presença desses organismos nos tecidos (REY, 2007).

#### 2.1.1 *Panagrellus redivivus* (Goodey)

Representante do filo Nematoda, os organismos do gênero *Panagrellus* estão divididos em 12 espécies distribuídas por quase todo globo (STOCK & NADLER, 2006). *Panagrellus redivivus* (Goodey) é um helminto de vida livre de tamanho diminuto, inferior a 01 mm, bastante cultivado e estudado. Empregado popularmente como fonte alimentar de peixes na aquariofilia, o organismo é usado como modelo experimental de ensaios biológicos com nematóides, sobretudo os da ordem Rhabditida (BLAXTER et al., 1998). Sua utilização decorre da facilidade de obtenção e praticidade na criação, adaptando-se bem as condições laboratoriais. Estudos com a família Strongyloididae, cujas espécies são de interesse humano e principalmente veterinário, são de difícil execução pela dificuldade de reprodução do ciclo biológico do nematóide. Nesses casos, a utilização do *P. redivivus* é devido a proximidade dos dois organismos, funcionando como modelo experimental, além da praticidade de obtenção adequada às condições laboratoriais (GEMS, 2000).

## 2.2. Ordem DIPTERA

A ordem Diptera constitui uma das maiores ordens de insetos conhecidas e descritas. A maioria deles distingue-se dos outros insetos alados por apresentarem apenas um par de asas, correspondente ao anterior, transformando-se o posterior em pequenas estruturas de equilíbrio denominadas halteres (RUPPERT & BARNES, 1996). Geralmente as espécies de Diptera compõem-se de insetos relativamente pequenos, porém, muitos com grande interesse econômico. Os pernilongos, borrachudos, biriguis, mutucas, moscas dos estábulos, além dos insetos hematófagos constituem sérias pragas para os homens e animais. As peças bucais dos adultos em Diptera são do tipo sugador, mas há considerável variação, podendo ser pungitivas, lambedoras ou ainda não funcionais (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A família Culicidae é representada pelas espécies de pernilongos e mosquitos, que possuem a importância na saúde pública. Os mosquitos são vetores de agentes de diversas doenças ao homem, incluindo vírus, bactérias e protozoários (REY, 2007). Insetos holometábolos, suas larvas aquáticas se adaptam a diferentes habitats, como lagos, poças, recipientes artificiais e até buracos em troncos de árvore. Da mesma forma, muitos desses mosquitos podem se adaptar das condições selvagens para os ambientes urbanos, multiplicando-se em criadouros artificiais próximos aos locais de repasto sanguíneo (MEDEIROS-SOUSA et al., 2013). Dotados de elevada antropofilia, alguns culicídeos não se afastam do corpo d'água em que se criaram, mantendo seu ciclo de vida próximo ao homem e seu domicílio. As medidas de controle dos culicídeos geralmente visam principalmente a eliminação dos estádios larvários, que podem ser monitorados e tratados com substâncias larvicidas para impedir a emergência das formas adultas.

### 2.2.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus)

Dentre as espécies mais importantes da família Culicidae, *A. aegypti* é originário da África, mas atualmente possui distribuição cosmopolita, incidindo nas regiões tropicais e sub-tropicais do globo (REY, 2007). Apresentando elevada antropofilia, adaptou-se aos ambientes urbanos podendo ser encontrado nas grandes cidades, onde há condições climáticas propícias e ocorrência de criadouros. Insetos sazonais, sua incidência está relacionada ao período posterior a época de

chuvas, que fornecem as condições ideais do desenvolvimento de suas larvas aquáticas (FORATTINI, 1996). A forma adulta habita próximo dos locais de repasto sanguíneo, que são realizados durante o dia e horário de crepúsculo apenas pelas fêmeas. A ovoposição ocorre invariavelmente em locais de água parada, podendo os ovos permanecer viável por até um ano. Após esse período, a larva pode eclodir desenvolvendo-se e formando pupas, de onde posteriormente emergem os adultos que formarão novos focos do mosquito (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A importância de *A. aegypti* na saúde pública decorre do papel vetorial que desempenha na transmissão de patógenos humanos, principalmente vírus. Atualmente a dengue é considerada a principal arbovirose do planeta, registrando milhares de casos ano após ano. Causada por quatro sorotipos de um flavivírus, a doença febril pode originar formas graves com o surgimento de sintomas hemorrágicos. A transmissão ocorre após a prática da hematofagia em paciente contaminado, tornando o mosquito vetor da doença. Com expectativa de vida de algumas semanas, o inseto pode sobreviver por até 45 dias, período em que pode continuar infectando outras pessoas (PONTES & RUFFINO-NETO, 1994)

No Brasil do século XIX, as epidemias de febre amarela atingiram praticamente todo território nacional, vitimando milhares de pacientes apenas no Rio de Janeiro, onde ao surto foi melhor documentado. A descoberta da transmissão da doença pelo culicídeo ainda era apenas uma teoria e somente a eliminação do *A. aegypti* no país interrompeu a transmissão da doença (UJVARI, 2003). Por outro lado, após a reintrodução do culicídeo novas epidemias se iniciaram e avançaram no território brasileiro. Na atual década, após o ano 2000, as epidemias de dengue vêm afetando um número crescente de pessoas nas cinco regiões do território. Oscilando de intensidade a cada ano, os casos de dengue normalmente se iniciam após o período de chuvas de verão, atingindo o pico próximo ao mês de maio, e perpetua a incidência da doença até a chegada do inverno (FORATTINI, 1996). Além disso, o uso extensivo dos inseticidas sintéticos favoreceu o surgimento de variedades resistentes desses mosquitos dificultando seu controle. Tal fato obrigou o surgimento de novas estratégias de combate ao *Aedes aegypti*, como os produtos derivados de bactérias entomopatogênicas, e, consequentemente, prevenção da dengue (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

### 2.3. Ordem LEPIDOPTERA

A ordem Lepidoptera reúne as borboletas e mariposas, sendo o grupo que apresenta o segundo maior número de espécies conhecidas de insetos, totalizando mais de 100.000 (RUPPERT & BARNES, 1996). Anatomicamente, possuem as mesmas características gerais dos insetos, isto é, com formas adultas com exoesqueleto e hexápodos, mas com o caráter distintivo da presença de asas membranosas cobertas por escamas, que se destacam facilmente. Da mesma forma, a maior parte do corpo e pernas desses insetos estão recobertas por escamas. Outra característica observável é a adaptação das peças bucais dos adultos para a sucção, com aparelho bucal sugador enrolado em repouso, estrutura denominada espirotromba (GALLO et al, 2002). Os insetos membros dessa ordem são holometábolos e suas larvas terrestres são denominadas lagartas.

A Ordem Lepidoptera apresenta insetos de grande interesse e importância econômica devido ao fato das lagartas serem vorazes e predominantemente fitófagas (GULLAN & CRANSTON, 2008). Diferentemente da ordem Diptera, cujas formas adultas apresentam maior relevância e causam prejuízos ao homem, em Lepidoptera as lagartas são as maiores causadoras de danos, funcionando como importantes pragas de plantas cultivadas e alimentos armazenados (GALLO et al., 2002). Os adultos geralmente se alimentam de néctar e possuem capacidade de vôo, não representando risco de prejuízo econômico. Por outro lado, as lagartas causam problemas nas lavouras começando a buscar o alimento incessantemente logo após a eclosão dos ovos.

Embora as partes aéreas sejam aparentemente mais visadas, as formas larvárias apresentam a dieta de amplo espectro, incluindo flores, folhas, frutas, sementes, troncos, hastes e até cogumelos (RUPPERT & BARNES, 1996). Se alimentando em grande quantidade, em pouco tempo a lagarta cresce e sofre seguidas ecdises. Ao total, serão entre 5 e 8 trocas de exoesqueleto, onde as formas larvárias aumentam de tamanho consideravelmente até empupar. Muitas vezes podem ser encontradas facilmente nas partes aéreas, o que torna seu combate de fácil execução. Por outro lado, algumas espécies vivem enterradas ou sob a superfície do solo, debaixo de folhas, tornando-se mais dificilmente afetadas pelos inseticidas (ZALUCKI et al., 2002).

### 2.3.1 *Duponchelia fovealis* (Zeller)

Mariposa da ordem Lepidoptera e gênero Crambidae, *Duponchelia fovealis* era encontrada originalmente no sul da Europa, região do Mediterrâneo, e atualmente é considerada uma das principais pragas emergentes (DARA, 2011). O inseto é encontrada afetando cultivares na região escandinávia, América do Norte e Ásia (SMITH et al., 2007). As lagartas atingem até 1,5 cm e possuem coloração branco-amarelada e cabeça preta. Durante o seu desenvolvimento assume um cor característica dependendo da planta hospedeira. Nessa fase, a lagarta se alimentando de forma regular até formar a pupa, período que leva em torno de 2 a 3 semanas (ZAWADNEAK et al., 2012). Nessa fase, a lagarta não se alimenta, permanecendo num casulo produzido com a teia e partículas do solo, onde realiza a metamorfose em uma ou duas semanas. A forma adulta sobrevive por aproximadamente 10 dias e a fêmea pode gerar até 200 ovos durante toda vida (SMITH et al., 2007). Em locais com temperaturas mais elevadas, esses períodos de desenvolvimento podem ser mais curtos, acelerando o ciclo de vida do lepidóptero. Em temperaturas extremamente baixas, acredita-se que o inseto não sobreviva, necessitando de abrigo para continuar o desenvolvimento (BRAMBILA & STOCKS, 2010).

As lagartas são polípagas, com o registro de 72 famílias botânicas afetadas, incluindo plantas aquáticas, se alimentando de folhas, flores e caule. Recentemente, a presença da mariposa foi reportada na América latina, causando prejuízos nas lavouras de produção de morangos e outros cultivares (ZAWADNEAK et al., 2012). Pode ser encontrada em estufas climatizadas além de lavouras cultivadas a céu aberto. A mariposa tem sido alvo de monitoramento do governo americano para a determinação de sua distribuição para a instituição de planos de manejo (BRAMBILA & STOCKS, 2010). Contudo, medidas de controle ainda não foram padronizadas, assim como inseticidas específicos à lagarta ainda não são conhecidos. Formulações produzidas a partir de *B. thuringiensis* são utilizadas com sucesso para o controle de espécies da ordem Lepidoptera. O gênero Crambidae também teve sua suscetibilidade comprovada para *Diatracea saccharalis*, contudo, os resultados com *D. fovealis* ainda não foram realizados (GITAHY et al., 2007; MACEDO et al., 2012).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON, A. Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cellular and Molecular Life Sciences 59(3): 417-425, 2002.

BEEGLE C.C. & YAMAMOTO T. Invitation paper (CP Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. The Canadian Entomologist 124(04): 587-616, 1992.

BIRD A.F. & BIRD J. The structure of nematodes. Second edition. Academic, San Diego, California, USA, 1991.

BLAXTER M. L., LEY P., GAREY J.R., LIU L.X., SCHELDEMAN P., VIERSTRAETE A. & VANFLETEREN J.R. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature 392(6671): 71-75, 1998.

BRAMBILA J. & STOCKS I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. Pest Alert, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 17 de Julho de 2001.

BRAVO A., SARABIA S., LOPEZ L., ONTIVEROS H., ABARCA C., ORTIZ A. & QUINTERO R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Applied and Environmental Microbiology, 64(12), 4965-4972, 1998.

BRAVO A., GILL S. S. & SOBERÓN M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. Toxicon 49: 423-435, 2007.

BRAVO A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S. S. & SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect biochemistry and molecular biology, 41(7), 423-431. 2011.

BRAVO A., GÓMEZ I., PORTA H., GARCÍA-GÓMEZ B. I., RODRIGUEZ-ALMAZAN C., PARDO L. & SOBERÓN M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnology 6(1): 17-26, 2013.

CONSOLI R.A.G.B. & OLIVEIRA R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.

COURA J.R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.

DARA S. European pepper moth: A pest of many host plants. SAT 10.38 : 47, 2011.

- DUTRA I.S., DÖBEREINER J. & SOUZA A.M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25(2), 115-119, 2005.
- FEDERICI B.A., PARK H.W. & BIDESHI D.K. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinology Journal* 3(2), 83-100, 2010.
- FORATTINI O.P. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia* Vol. 2. Edusp, São Paulo, 1996.
- GALLO D., NAKANO O., SILVEIRA-NETO S., CARVALHO R.P.L., BAPTISTA G.C., BERTI-FILHO E., PARRA J.R.P., ZUCCHI R.A., ALVES S.B., VENDRAMIN J.D., MARCHINI L.C., LOPES J.R.S., OMOTO C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GEMS D. Longevity and ageing in parasitic and free-living nematodes. *Biogerontology* 1, 289–307, 2000.
- GITAHY, P. D. M., SOUZA, M. T. D., MONNERAT, R. G., ARRIGONI, E. D. B., & BALDANI, J. I. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 531-537, 2007.
- GULLAN P.J. & CRANSTON P.S. *Os insetos: um resumo de entomologia*. Roca, São Paulo, 2008.
- GUPTA R.B. & SHEPHERD K.W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. *Theoretical and Applied Genetics* 80(1), 65-74, 1990.
- HADRYIS H., BALICK M. & SCHIERWATER B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, 1(1), 55-63, 1992.
- HENRIQUE W., SAMPAIO A.A.M., LEME P.R., ALLEONI G.F., LANNA D.P.D. & MALHEIROS E.B. Digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados à base de dietas com elevado teor de concentrado e níveis crescentes de polpa cítrica peletizada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(6), 2007-2015, 2003.
- HERNANDEZ R., CAZETTA J.O. & MORAES V.D. Frações nitrogenadas, glicídicas e amônia liberada pela cama de frangos de corte em diferentes densidades e tempos de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(4), 1795-1802, 2002.
- KUMAR A., SRA K., SANGODKAR U.M.X. & SHARNA V.P. Advances in the bio-control of mosquito vector utilizing *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* var. *israelensis*. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences India* 70: 1-20, 2000.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685, 1970.

LIU M., CAI Q.X., LIU H.Z., ZHANG B.H., YAN P.J., YUAN Z.M. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology* 93(3): 374-379, 2002.

LOBATO F.C.F., SALVARANI F.M., SILVA R.O.S.S., SOUZA M.A.S., LIMA C.G.R.D.L., PIRES P.S.I. & AZEVEDO E.D. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. *Ciência Rural*, 38(4), 1176-1178, 2008..

LYNCH M. & MILLIGAN B. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3(2), 91-99, 1994.

MACEDO C.L.D., MARTINS É.S., MACEDO L.L.P.D., SANTOS A.C.D., PRAÇA L.B., GÓIS L.A.B.D. & MONNERAT, R. G. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* efficient strains against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(12), 1759-1765, 2012.

MEDEIROS-SOUSA A.R., CERETTI-JUNIOR W., URBINATTI P.R., NATAL, D., CARVALHO, G.C.D., PAULA M.B.D., FERNANDES A., MELLO M.H.S.H, OLIVEIRA R.C., ORICO L.C., GONÇALVES E.F.B. & MARRELLI, M. T. Mosquito (Diptera: Culicidae) survey in parks of São Paulo City I. *Biota Neotropica*, 13(1), 2013.

MONETTE R., POTVIN L., BAINES D., LAPRADE R. & SCHWARTZ J. L. Interaction between Calcium Ions and *Bacillus thuringiensis* Toxin Activity against Sf9 Cells (Spodoptera frugiperda, Lepidoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 440-447, 1997.

PONTES R.J.S. & RUFFINO-NETO A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Revista de Saúde Pública* 28(3): 218-227, 1994.

RAMOS P.R., PRATES Ê.R., FONTANELLI R.S., JARDIM J.O. & BARCELLOS I.B.B. Uso do Bagaço de Mandioca em Substituição ao Milho no Concentrado para Bovinos em Crescimento. 1. Consumo de Matéria Seca, Matéria Orgânica e Proteína Bruta. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29(1), 295-299, 2000.

RAUPP D.D.S., MOREIRA S.D.S., BANZATTO D.A. & SGARBIERI V.C. Composição e propriedades fisiológico–nutritivas de uma farinha rica em fibra insolúvel obtida do resíduo fibroso de fecularia de mandioca, 1999.

REY L. Parasitologia 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RODRIGUES P.H.M., BORGATTI L.M.O., GOMES R.W., PASSINI R. & MEYER P.M. Efeito da adição de níveis crescentes de polpa cítrica sobre a qualidade fermentativa eo valor nutritivo da silagem de capim-elefante. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(4), 1138-1145, 2005.

RUPPERT E. & BARNES R.D. Zoologia dos Invertebrados. 6ª. Ed. São Paulo: Editora Roca, 1996

SAMPSON M.N. & GOODAY G.W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* 144(8): 2189-2194, 1998

SANTOS T. M. & LUCAS JR J.D. Balanço energético em galpão de frangos de corte. *Engenharia Agrícola*, 24(1), 25-36, 2004.

SIEGEL, J.P. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 77(1): 13-21, 2001.

SMITH R.M., BAKER R.H., MALUMPHY C.P., HOCKLAND S., HAMMON R.P., OSTOJÁ-STARZEWSKI J.C. & COLLINS D.W. Recent non-native invertebrate plant pest establishments in Great Britain: origins, pathways, and trends. *Agricultural and Forest Entomology*, 9(4), 307-326, 2007.

STEWART JR C.N. & VIA L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5), 748-750, 1993.

STOCK S.P. & NADLER S.A. Morphological and molecular characterisation of *Panagrellus spp.* (Cephalobina: Panagrolaimidae): taxonomic status and phylogenetic relationships. *Nematology*, 8(6), 921-938, 2006.

TAYLOR M.A., COOP R.L., WALL R.L. *Parasitologia Veterinária*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

UJVARI S.C. A história e suas epidemias: a convivência do homem com os micro-organismos. São Paulo: Senac, 2003.

VACHON V., LAPRADE R. & SCHWARTZ J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of invertebrate pathology*, 111(1): 1-12, 2012.

VU K.D., YAN S., TYAGI R.D., VALERO J.R. & SURAMPALLI R.Y. Induced production of chitinase to enhance entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* employing starch industry wastewater as a substrate. *Bioresource technology*, 100(21), 5260-5269, 2009.

ZALUCKI, M. P., CLARKE, A. R. & MALCOLM, S. B. Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual review of entomology*, 47(1), 361-393, 2002.

ZAWADNEAK M.A.C, VIDAL H.R., SANTOS B. Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). In: Vilela E, Zucchi RA (Org.). *Pragas Introduzidas: Insetos e Acaros*. 2ed. Piracicaba, SP: ESALQ/ FEALQ, 2012.

## CAPÍTULO 1

### **Evolução e distribuição da dengue no estado do Paraná, Brasil, em 2009-2012**

*(Submetido à revista Epidemiologia e Controle de Infecção)*

André Luiz de Almeida Melo, Rosângela Clara Paulino, Edilene Alcântara de Castro, Vanete Thomaz Soccol, Carlos Ricardo Soccol

#### **ABSTRACT**

The occurrence of dengue cases in Paraná State was analyzed from the Health Department records in the period 2009 to 2012. The data were grouped according to the local transmission, the Regional of Health and severe forms of the disease: dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue with complications (DWC). The largest number of indigenous cases was observed in 2009-2010, with 33,500 records concentrated in the western and northern regions of the state. In the period 2010-2011, there were 28,511 confirmed cases, mostly in the northwest. In 2011-2012 there was a marked decrease in the number of cases, totaling 2,400. The DHF and DWC were highest in 2010-2011, with 105 and 128, respectively. Three virus serotypes were isolated, mainly DEN-1. The distribution of dengue in Paraná was not homogeneous, suffering the influence of neighboring states beyond the particular characteristics of each region.

#### **INTRODUÇÃO**

Considerada a arbovirose mais importante no mundo, a dengue possui incidência elevada nas regiões tropicais dos quatro continentes, onde se estima que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco<sup>1</sup>. No Brasil, durante 60 anos não ocorreram registros de epidemias de dengue, graças ao sucesso das campanhas de prevenção à febre amarela e malária, que nas primeiras décadas do século XX eliminaram o *Aedes aegypti* no Brasil<sup>2</sup>. Porém, desde a re-introdução do vetor durante a epidemia de dengue de 1981-1982 em Boa Vista (RR), o culicídeo se disseminou descontroladamente atingindo todas as regiões do país. Concomitantemente, a dengue se distribuiu rapidamente e, a partir da segunda

metade da década de 90, as epidemias da doença se tornaram bastante frequentes, alternando as regiões afetadas, mas sempre com número elevado de casos<sup>3</sup>. A presença do quarto sorotipo do vírus da dengue aumentou o temor pelas formas graves da doença, como a febre hemorrágica de dengue (FHD) e a dengue com complicações (DCC).

Na última década, a dengue vem merecendo lugar de destaque nas estratégias de prevenção dentre as doenças de alta incidência em território brasileiro<sup>4</sup>. Sua ocorrência nos grandes centros é facilitada pelas condições urbanas encontradas, com grande variedade de criadouros artificiais disponíveis ao vetor, tornando as campanhas de controle ainda mais difíceis<sup>5</sup>. Apesar da complexidade na prevenção, alguns importantes aspectos da incidência da dengue já são bastante conhecidos. Um deles é a sazonalidade, cujo período mais favorável à multiplicação do vetor e, conseqüentemente, disseminação da doença é aquele posterior à estação de chuvas de verão. Da mesma forma, o período de estiagem, que acompanha o inverno, inibe a distribuição do *Aedes aegypti* e determina a interrupção da transmissão e ocorrência da doença<sup>6</sup>.

Algumas características particulares do Estado do Paraná tornam a incidência da dengue diferenciada em relação às demais regiões do Brasil. Unidade da federação mais setentrional da região sul, o norte do estado é atravessado pelo trópico de Capricórnio, que determina a transição entre o clima tropical e subtropical<sup>7</sup>. Sendo assim, podem-se encontrar temperaturas e climas distintos no mesmo território, como o norte do Estado com características semelhantes das encontradas na região sudeste do Brasil, com temperaturas mais elevadas, e o restante do território com um clima subtropical típico. A altitude também é um fator importante, influenciando nas baixas temperaturas e restringindo a presença do vetor<sup>8</sup>. Por esses motivos, a presença de *Aedes aegypti* e da dengue é fortemente favorecida no norte, noroeste e região central. No restante do Estado, as baixas temperaturas do clima subtropical e as altitudes da Serra do Mar e planaltos paranaenses inibem a presença do vetor e a transmissão do vírus.

Durante muito tempo, o Estado do Paraná ocupou uma posição discreta na incidência nacional da dengue. Apesar de deter a maioria dos casos de dengue da região sul, a presença da doença sempre foi tímida quando comparada com o restante do país<sup>9</sup>. Acreditava-se que as baixas temperaturas e altitudes elevadas seriam obstáculos intransponíveis às epidemias da doença. Isso começou a mudar

no ano de 2007, quando foram registrados 25.070 casos autóctones, elevando para 238,49 casos / 100.000 habitantes, o que configurou o Estado como região de média incidência de dengue<sup>10</sup>.

Desde então, a presença da dengue no Paraná tem sido foco das autoridades sanitárias estaduais, em busca de eficiência nas campanhas de prevenção, agilidade nos diagnósticos e tratamento adequado<sup>11</sup>. Contudo, apesar de todos os esforços, os dados ainda apontam para um crescimento no número de casos. Estudos e levantamentos sobre a distribuição desses casos são necessários para a melhor compreensão da doença e sua incidência no Paraná.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência dos casos autóctones de dengue no estado do Paraná no período compreendido entre 2009 e 2012. As formas clínicas da doença foram analisadas assim como o local de transmissão, dividido geograficamente de acordo com as Regionais de Saúde das quais os municípios fazem parte. Os fatores que possam estar influenciando na distribuição foram discutidos e relacionados com o panorama nacional da doença.

## **MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Estado do Paraná, sul do Brasil. O estado conta com uma área de 199.314,850 km<sup>2</sup>, representando 34,58% da Região Sul do país e 2,34% da área total do território brasileiro. Segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população do estado é estimada em 10.439.601 habitantes em 2010, com uma densidade demográfica de 52,38 hab./km<sup>2</sup>. O estado possui 399 municípios, divididas em dez mesorregiões e administrativamente separadas em 22 Regionais de Saúde.

Este é um estudo epidemiológico descritivo da ocorrência e distribuição dos casos de dengue no Paraná nos anos de 2009 a 2012. Cada período estudado teve início na 31<sup>a</sup> semana epidemiológica e perdurou até a 30<sup>a</sup> semana do ano seguinte, tempo que compreende a época de chuvas e estiagem, correspondente ao início e término da transmissão do vírus pelo vetor.

Foram utilizados dados registrados nos bancos de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), além dos dados da Secretaria de Saúde de Estado (SESA/PR) acessados pelo programa Tabwin versão 3.2. Os

boletins regionais da dengue, fornecidos pelas secretarias de Saúde dos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, também foram empregados.

Os registros foram divididos conforme a notificação e a confirmação. O local de transmissão foi agrupado de acordo com a Regional de Saúde do município, podendo ser classificados como autóctones ou importados. As formas graves, incluindo febre hemorrágica da dengue (FHD) e dengue com complicações (DCC) foram quantificadas. A sorotipagem do vírus no período, resultado do isolamento viral, foi realizada no LACEN. A população dos municípios da Regional de Saúde e o coeficiente de incidência da doença nos locais correspondentes foram extraídos dos boletins periódicos da dengue.

O estudo foi realizado de acordo com os preceitos éticos, sem prejuízo para os usuários e sem identificação de pessoas ou pacientes, uma vez que foram utilizados dados secundários disponibilizados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde de Estado (SESA/PR).

## **RESULTADOS**

No período epidêmico de 2009-2010, foram notificados 61.208 casos de dengue, sendo que 33.055 foram confirmados, destes 32.456 foram autóctones e 599 importados (Tabela 1). Sete das 22 Regionais de Saúde não apresentaram registros autóctones da doença no período e oito foram consideradas de alta incidência de dengue, isto é, índice superior a 300 casos / 100.000 habitantes (Figura 1A). Em Foz do Iguaçu (9<sup>a</sup>) e Maringá (15<sup>a</sup>) foram registrados os maiores números de casos autóctones, com 10.802 e 9.603, respectivamente. As maiores incidências também foram obtidas nessas Regionais, com 2.395,7 e 1.340,7 casos de dengue / 100.000 habitantes. Esses valores tornaram o Paraná, pela primeira vez, um estado de elevada incidência de dengue, com 308,8 casos / 100.000 habitantes. O isolamento viral foi obtido em 208 amostras, sendo 180 (87%) do tipo DEN-1 e 28 (13%) do DEN-2.

No período seguinte, foram notificados 65.649 casos de dengue, destes 29.207 foram confirmados, sendo 28.511 casos autóctones e 696 importados (Tabela 1). Oito das 22 Regionais de Saúde (36%) não apresentaram registros da doença nesse período e quatro (18%) foram consideradas de alta incidência de dengue. Em Londrina (17<sup>a</sup>) e Jacarezinho (19<sup>a</sup>) foram registrados os maiores



números de casos autóctones, com 12.072 e 4.752, respectivamente. As incidências mais elevadas foram verificadas nas Regionais de Saúde de Cornélio Procópio (18ª) e Jacarezinho (19ª), com 2.070,2 e 1.709,4 casos de dengue / 100.000 habitantes, respectivamente. A ligeira queda nos valores tornou o Paraná um estado de média incidência para a dengue (índice superior a 100 casos / 100.000 habitantes), com 273,10 casos / 100.000 habitantes. Três sorotipos do vírus foram obtidos, DEN-1, DEN-2 e DEN-4, com 211 (95%), 10 (4%) e 2 (1%), respectivamente.

**Tabela 1.** Casos autóctones, importados e incidência (100.000 habitantes), por Regional de Saúde (1ª a 22ª) nos períodos epidêmicos (2009-2010, 2010-2011 e 2011-2012), no estado do Paraná.

REGIONAL DE SAÚDE	2009-2010			2010-2011			2011-2012		
	Autóc	Import	Incid	Autóc	Import	Incid	Autóc	Import	Incid
1ª Paranaguá	0	6	-	0	8	-	0	5	-
2ª Metropolitana	0	27	-	0	79	-	0	30	-
3ª Ponta Grossa	0	1	-	0	3	-	0	4	-
4ª Irati	0	0	-	0	0	-	0	3	-
5ª Guarapuava	0	14	-	0	4	-	1	2	0,23
6ª União da Vit.	0	0	-	0	0	-	0	2	-
7ª Pato Branco	2	2	0,8	0	7	-	0	5	-
8ª Fco Beltrão	403	14	128,6	79	22	23,4	535	6	158,4
9ª Foz do Iguaçu	10.802	130	2.395,6	4.268	99	1.097,8	150	22	38,6
10ª Cascavel	887	34	176,7	731	56	144,1	122	32	24,1
11ª C. Mourão	2.373	77	760,7	272	14	81,4	50	11	15,0
12ª Umuarama	1.197	65	511,0	354	21	133,5	273	29	103,0
13ª Cianorte	517	22	395,6	17	11	11,9	3	7	2,1
14ª Paranavaí	1.045	18	411,0	172	19	66,0	160	23	61,4
15ª Maringá	9.603	115	1.340,6	652	29	88,9	130	14	17,7
16ª Apucarana	27	8	8,0	74	49	21,3	0	9	-
17ª Londrina	3.028	40	351,1	12.072	98	1.385,6	633	33	72,7
18ª C. Procópio	1.190	15	524,1	4.678	92	2.070,2	159	8	70,4
19ª Jacarezinho	495	5	182,1	4.752	38	1.709,4	6	8	2,2
20ª Toledo	853	37	263,6	294	38	82,0	178	24	49,7
21ª Tel. Borba	0	0	-	0	2	-	0	0	-
22ª Ivaiporã	2	1	1,5	96	7	68,9	0	1	-
<b>TOTAL</b>	<b>32.456</b>	<b>599</b>	<b>308,8</b>	<b>28.51</b>	<b>696</b>	<b>273,1</b>	<b>2.400</b>	<b>278</b>	<b>23,0</b>

No período epidêmico de 2011-2012, observou-se redução drástica nos números, com 23.762 notificações de casos de dengue, com 2.678 confirmações,

2.400 autóctones e 278 importados (Tabela 1). Nove Regionais de Saúde não apresentaram registros autóctones da doença nesse período e onze foram consideradas de baixa incidência, não atingindo 100 casos de dengue / 100.000 habitantes. Os maiores números de casos autóctones de dengue foram observados nas Regionais de Londrina (17<sup>a</sup>) e Francisco Beltrão (8<sup>a</sup>), com 633 e 535, respectivamente. As maiores incidências foram da Regional de Francisco Beltrão (8<sup>a</sup>) e Umuarama (12<sup>a</sup>), com 158,4 e 103,0 casos de dengue / 100.000 habitantes, configurando áreas de média incidência de dengue. Três sorotipos foram detectados, DEN-1, DEN-2 e DEN-4, com 40 (95%), 1 (2%) e 1 (2%) amostra, respectivamente.

As formas graves da dengue também foram detectadas nesses períodos. Em 2009-2010, registraram-se 115 casos de dengue com complicações e 58 de febre hemorrágica da dengue. No período epidêmico de 2010-2011, foram totalizados 128 de DCC e 105 de FHD. Em 2011-2012 foram contabilizados 16 casos de DCC e 4 de FHD.

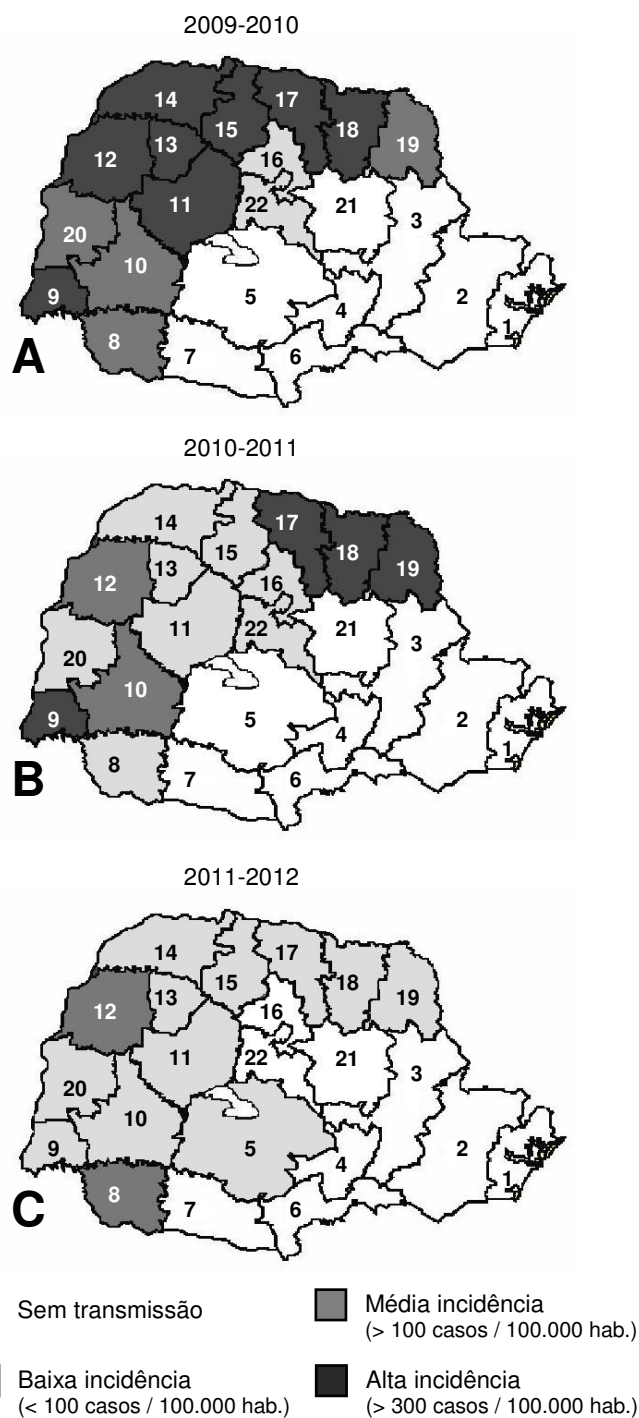


Figura 1: Incidência da dengue no Paraná nas 22 Regionais de Saúde nos três períodos estudados (A- 2009-2010, B-2010-2011 e C- 2011-2012).

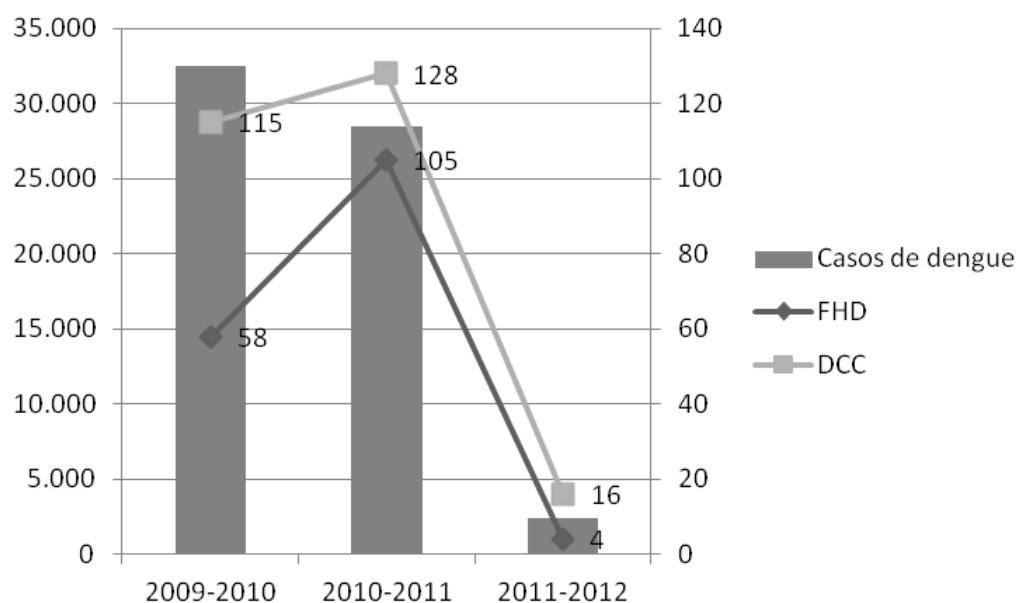


Figura 2: Casos autóctones de dengue e formas graves da doença (febre hemorrágica da dengue e dengue com complicações) no período de 2009-2012 no estado do Paraná, Brasil.

## DISCUSSÃO

Atualmente, a ocorrência da dengue na América do Sul e Central é responsável por mais da metade do total de casos de dengue registrados no mundo<sup>12</sup>. Da mesma forma, no Brasil, a incidência é considerada elevada, superando os 300 casos / 100.000 habitantes em várias regiões do país, sobretudo sudeste, nordeste e centro-oeste<sup>12</sup>.

Na região sul, a dengue se tornou um sério problema de saúde pública recentemente, na segunda metade da última década, com focos da doença no Paraná. Dentro do período estudado neste trabalho, houve registro de um número elevado de casos de dengue, principalmente no período epidêmico de 2009-2010, com a maior incidência já registrada no estado, 308,8 / 100.000 habitantes, configurando área de alta incidência. Um fenômeno parecido também foi observado nos estados vizinhos ao Paraná, cujos registros de dengue em São Paulo e Mato Grosso do Sul atingiram patamares ainda mais elevados em 2010, com 205.520 e 62.332 casos, respectivamente<sup>13</sup>.

Entretanto, algumas diferenças foram determinantes na ocorrência da dengue nesses locais. Apesar do número elevado de casos em São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná no período epidêmico de 2009-2010, no intervalo seguinte verificaram-se reduções de 45% e 88% em São Paulo e Mato Grosso do Sul, respectivamente<sup>13</sup>. No estado do Paraná o decréscimo foi menor, com aproximadamente 15% em relação ao período anterior.

No estado do Paraná, embora a quantidade de casos tenha pouco se alterado nesses dois períodos (2009-2010 e 2010-2011), a análise da distribuição geográfica apontou para mudanças nos locais de incidência da doença. No período 2009-2010, mais de 62% dos casos de dengue concentraram-se nos municípios pertencentes a duas Regionais de Saúde, Foz do Iguaçu (9ª) e Maringá (15ª) que somaram 20.405 casos autóctones. No período seguinte, observou-se uma grande redução no número de registros nesses locais, com 5.048, queda de 75,3% em relação ao período anterior e 17,7% do total de casos no Paraná. Não exclusivamente nessas áreas, mas em toda região oeste e noroeste do estado houve um decréscimo acentuado no número de registros, com quedas nos municípios da 10ª, 11ª, 12ª, 13ª, 14ª e 22ª Regionais de Saúde (Figura 1B).

Contudo, essas reduções foram compensadas pelo aumento no número de casos em outros locais do Estado. Nos municípios pertencentes às Regionais de Saúde de Londrina (17ª), Cornélio Procopio (18ª) e Jacarezinho (19ª), que contabilizaram 4.713 casos autóctones de dengue em 2009-2010, registraram 21.502 casos no período seguinte, acréscimo de 256,2% e 76% do total do Estado no período. Graças a esse aumento localizado na região nordeste do Estado (Figura 1B), o número final de casos de dengue pouco decaiu no Paraná no período de 2010-2011, diferentemente do observado nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, que apresentaram reduções acentuadas de 45 e 88%, respectivamente<sup>14</sup>.

Quanto à ocorrência de formas graves da doença, febre hemorrágica da dengue (FHD) e dengue com complicações (DCC), verificou-se uma evolução do número de casos diferenciada (Figura 2). No período de 2009-2010, período em que os casos de dengue atingiram o auge, a FHD e DCC alcançaram, respectivamente, 58 e 115 casos. Na temporada seguinte, quando os casos de dengue tiveram uma redução próxima a 15%, as formas graves tiveram elevação atingindo 105 registros para FHD e 128 de DCC. Esse dado é particularmente importante quando lembramos que em 2007, na primeira grande epidemia de dengue no Paraná, com

mais de 25 mil casos, foram verificados apenas 9 registros de FHD e 6 de DCC<sup>10</sup>. Alguns fatores podem explicar esse aumento, como a imunização prévia por outro sorotipo, já que entre 2003 e 2008 apenas o sorotipo DEN-3 teve ocorrência no Paraná<sup>15</sup>. Outro fator relevante foi a padronização e otimização do diagnóstico das formas graves, tendo o aprimoramento técnico oriundo da crescente demanda. A tendência no aumento de internações hospitalares em decorrência das formas graves da dengue já foi alertada<sup>3</sup>, porém, como a dengue é um problema de saúde pública relativamente recente no Paraná, somente agora começam a aparecer os reflexos desse fenômeno.

O período epidêmico de 2011-2012 foi marcado pela redução drástica na incidência da dengue no Paraná, correspondendo a menos que 10% do índice registrado no período anterior. As formas graves também apresentaram recuo, totalizando 4 e 16 casos de FHD e DCC, respectivamente. Nas Regionais de Saúde Foz do Iguaçu (9ª) e Maringá (15ª), responsáveis pelo pico de registros de dengue de 2009-2010, 150 e 130 casos de dengue, respectivamente, foram observados. As Regionais de Londrina (17ª), Cornélio Procopio (18ª) e Jacarezinho (19ª), responsáveis por mais de 21 mil registros no período 2010-2011, contabilizaram 633, 159 e 6 casos de dengue respectivamente<sup>16</sup>.

Semelhante decréscimo também foi observado principalmente no estado de São Paulo, cujo número de casos também configurou região de baixa incidência da doença (até 100 casos / 100.000 habitantes)<sup>17</sup>. Uma característica observada no período de 2011-2012 foi a concentração dos principais focos nos Estados da região Norte, Nordeste e Centro-oeste, diferentemente do observado no ciclo de 2010-2011, que também incluía a região Sudeste<sup>14</sup>. O estado do Mato Grosso de Sul registrou pequeno decréscimo de casos de dengue, porém, com valores ainda elevados que mantém o Estado como área de alta incidência da doença<sup>18, 19</sup>. Na região centro-oeste, diferentemente do sul e sudeste, os casos de dengue aumentaram nesse período e os estados de Tocantins e Mato Grosso estão com a epidemia mais intensa<sup>20</sup>. Essa oscilação é um comportamento naturalmente observado na ocorrência da dengue, com a alternância de grandes epidemias com períodos de baixa incidência e com mudança constante das regiões epidêmicas.

Um exemplo foi observado no período epidêmico de 2011-2012, quando a Regional de Saúde de Francisco Beltrão (8ª) registrou a maior incidência histórica de dengue, apesar do grande recuo no número de casos no período. Localizada no

sudoeste do estado, região pouco propícia ao vetor e contrariando a tendência de queda, o número de casos nesse período subiu de 79 em 2010-2011 para 535 casos autóctones em 2011-2012. A maioria desses registros foram oriundos do município de Francisco Beltrão, que contabilizou 519 registros autóctones, correspondendo a 657,32 / 100.000 habitantes e determinando área de alta incidência de dengue. Tal fato demonstra que as medidas de controle populacional do *Aedes aegypti* ainda são as mais eficazes para se evitar a doença<sup>3</sup>.

## AGRADECIMENTOS

A Ronaldo Trevisan (SESA-PR), pelo interesse e disposição em levantar os dados da dengue no Paraná, além dos esclarecimentos referentes à distribuição da doença.

## RESUMO

**Objetivo:** Analisar a ocorrência e distribuição da dengue no estado do Paraná no período de 2009 a 2012. **Métodos:** Os dados foram obtidos junto aos registros do SINAN na Secretaria de Saúde do estado e agrupados conforme o local de transmissão, a Regional de Saúde do município e formas graves da doença: febre hemorrágica da dengue (FHD) e dengue com complicações (DCC). **Resultados:** O maior número de casos autóctones foi observado no período 2009-2010, com 33.500 registros, concentrados nas regiões oeste e norte do Estado. No período 2010-2011, registraram-se 28.511 casos confirmados, principalmente no noroeste. No período epidêmico de 2011-2012 observou-se um decréscimo acentuado no número de casos, totalizando 2.400. A FHD e DCC tiveram pico em 2010-2011, com 105 e 128, respectivamente. Três sorotipos do vírus foram isolados, com predomínio do DEN-1. **Conclusão:** O número de casos de dengue apresentou oscilações no período estudado e a distribuição da doença no Paraná não foi homogênea, sofrendo a influência dos estados vizinhos além das características particulares de cada região.

Palavras-chave: arbovirose, incidência, *Aedes aegypti*, DEN-1, região sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad. Saúde Pública 2002; 18(3): 867-871.
2. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde 2007; 16(2): 113-118.
3. Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde 1999; 8: 5-33.
4. Penna ML. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. Cad. Saúde Pública 2003; 19(1): 305-309.
5. Tauil PL. Urbanização e Ecologia do Dengue. Cad. Saúde Pública 2001; 17: 99-102.
6. Souza SS, Silva IG, Silva HHG. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti* no Estado de Goiás. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43:152–155.
7. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:192-196.
8. Donalísio MR, Glasser CM. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. Rev Bras Epidemiol 2001; 5:259-72.
9. Barcellos C, Pustai AK, Weber MA, Brito MRV. Identificação de locais com potencial de transmissão de dengue em Porto Alegre através de técnicas de geoprocessamento. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(3):246-50.
10. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA). Boletim informativo dengue n.º 1/2008. Curitiba: Superintendência de Vigilância em Saúde, 2008.
11. Omotto CA, Santini SML, Esteves JLM. Controle da dengue: uma análise da implementação do PNCD e a relação do processo de trabalho na 16ª RSA. Apucarana/ Paraná - Brasil. Revista do II Congresso CONSAD de Gestão Pública. Porto Alegre, RS; 2008. p 69-70.
12. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. Rev Estudos Avançados 2008; 22:53-72.
13. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Informe Epidemiológico da Dengue Análise de situação e tendências - 2010. Brasília: Ministério da Saúde 2010.
14. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Balanço Dengue - Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011. Brasília: Ministério da Saúde 2011.



15. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação Paraná. Brasília: Ministério da Saúde 2011.
16. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA). Situação da Dengue no Paraná, Informe técnico 56, Período 2011/2012 – Semana 31/2011 a Semana 22/2012. Superintendência de Vigilância em Saúde, 2012.
17. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac (CVE). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Boletim Epidemiológico 2012; 2(11).
18. Secretaria de Estado de Saúde de mato Grosso do Sul (SES). Boletim de Resposta Coordenada no Monitoramento da Dengue n.º 46. Campo Grande: Conselho Estadual de Saúde/MS 2011.
19. Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul (SES). Boletim de Resposta Coordenada no Monitoramento da Dengue n.º 24. Campo Grande: Conselho Estadual de Saúde/MS 2012.
20. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde 2012; 43(1).

## CAPÍTULO 2

**Toxicidade dos isolados de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de *Aedes aegypti* (Linnaeus), *Duponchelia fovealis* (Zeller) e *Panagrellus redivivus* (Goodey) e estudo do polimorfismo**

André Luiz de Almeida Melo, André Luís Lopes da Silva, Maria Aparecida Cassilhas Zawadneak, Vanete Thomaz-Soccol e Carlos Ricardo Soccol

**RESUMO**

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram positiva de crescimento aeróbico utilizada na formulação de inseticidas biológicos. As cepas do micro-organismo podem ter afinidade a diferentes espécies de invertebrados, sendo indicados no controle de diversos organismos considerados pragas humanas, animais e agrícolas. Bioensaios são eficientes na aferição da toxicidade e ferramentas moleculares são indicadas para o estudo do polimorfismo. Neste trabalho, isolados nativos de *Bacillus thuringiensis* provenientes do Paraná, Brasil, foram utilizados na produção de biopesticidas e a toxicidade foi aferida contra *Aedes aegypti*, *Duponchelia fovealis* e *Panagrellus redivivus*. A composição protéica dos isolados de maior toxicidade foi analisada por SDS-PAGE e o polimorfismo foi estudado por RAPD-PCR. Nos testes com *A. aegypti*, o isolado nativo que propiciou maior mortalidade de larvas foi o isolado denominado BR-01, que alcançou 96,7% de mortalidade de larvas,  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 11,76  $\mu\text{L.L}^{-1}$  e 21,61  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , respectivamente. Nos testes com *D. fovealis*, o melhor desempenho foi gerado com o isolado BR-09, obtendo  $CL_{50}$  de 13,74  $\mu\text{L}$ , alcançando 79,2% de mortalidade da lagarta. Nos ensaios com *P. redivivus*, as linhagens que apresentaram as maiores atividades nematocidas foram BR-04 e BR-12, com  $CL_{50}$  de 37,30  $\mu\text{L.L}^{-1}$  e 42,77  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , alcançando até 95% e 70% de mortalidade respectivamente. Os resultados demonstram a importância do estudo da diversidade genética e atividade biológica de novos isolados de *B. thuringiensis*, tendo em vista que as três linhagens nativas selecionadas pela toxicidade aos três organismos alvos avaliados apresentaram índices de similaridade reduzidos entre si.

**Palavras-chaves:** Biopesticida, bactéria, bioensaio, invertebrados, pragas.

## INTRODUÇÃO

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é a bactéria produtora de endotoxina mais usada na produção de inseticidas microbianos em todo mundo. Micro-organismo gram positivo e com crescimento aeróbico, a bactéria apresenta eficiência no controle biológico de várias espécies de invertebrados, possuindo grande número de formulações disponíveis no mercado (FABRIS et al, 2012; FIÚZA et al., 2012; POOPATHI e ARCHANA, 2012). Ambientalmente mais seguros, com elevada especificidade e não cumulativos na cadeia trófica, os produtos derivados de *B. thuringiensis* se tornaram importantes ferramentas no combate de pragas resistentes aos inseticidas sintéticos, usados por décadas muitas vezes de forma indiscriminada (NIEDMANN & MEZABASSO, 2006). Além disso, podem funcionar como uma opção de baixo impacto ambiental para o manejo de pragas introduzidas na agricultura, como espécies de Lepidoptera. Em uma agricultura que privilegia alimentos de qualidade, os inseticidas biológicos possibilitam a conquista de novos mercados pela redução da contaminação por agrotóxicos, sendo um diferencial na exportação (CARVALHO et al., 2000).

O mecanismo de ação do Bt é gerado através dos cristais protéicos produzidos durante a esporulação. Ativada pelo pH alcalino do trato digestivo após a ingestão, a endotoxina se fragmenta dando origem às proteínas Cry e Cyt, formas biologicamente ativas. Em seguida, interações moleculares entre esses peptídeos e os receptores nas células do epitélio digestivo desencadeiam a formação de poros na parede celular, afetando o equilíbrio osmótico e provocando a lise celular (BRAVO et al., 2007). Ocorrendo de forma irreversível, observa-se paralisia seguida de morte do organismo em poucas horas.

Atualmente os produtos derivados de *B. thuringiensis* costumam ser usados no controle de diversas espécies de invertebrados de interesse, tanto na saúde pública como na agricultura. Atualmente no mercado existem disponíveis pesticidas produzidos com cepas de Bt com elevada toxicidade para larvas de culicídeos, lepidópteros e coléopteros, além de formulações indicadas para o controle de nematódeos (KOVENDAN et al., 2011; BAXTER et al., 2011; EKOBUE et al., 2010; HU et al. 2010). Tamanha amplitude de utilizações foi possível com a realização de testes de mortalidade, que podem verificar a suscetibilidade do organismo alvo e a eficiência dos bioinseticidas produzidos com Bt.

A toxicidade produzida pela bactéria está diretamente relacionada à forma do gene Cry presente no micro-organismo, que determina a proteína de ação larvícida. Também influenciado pelo polimorfismo existente, o gene pode determinar a eficiência e afinidade ao organismo alvo. O estudo e a compreensão dos polimorfismos genéticos podem ser extremamente úteis para a elaboração de bioinseticidas de *B. thuringiensis*, auxiliando na escolha de estirpes de maior toxicidade (KUMAR et al., 2010, SHA et al., 2011). Para tanto, a utilização de ferramentas moleculares que discriminem os micro-organismos tem sido realizada com sucesso, auxiliando na otimização dos inseticidas biológicos (BRODERICK et al. 2009). Dentre elas, a amplificação aleatória por RAPD é considerada de fácil execução, rápida e de baixo custo (KUMAR et al., 2010). A técnica ainda permite o estudo de organismos selvagens e nativos ainda não sequenciados (RIVERA & PRIEST, 2003).

O presente trabalho tem como objetivos: 1) avaliar a toxicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* nativos do Paraná em bioensaios laboratoriais com *Aedes aegypti* (Linnaeus), *Duponchelia fovealis* (Zeller) e *Panagrellus redivivus* (Goodey), 2) analisar o perfil protéico por SDS-PAGE dos isolados que propiciarem os melhores resultados de mortalidade e 3) analisar o perfil genético por RAPD em comparação com a cepa referência IPS-82.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Preparo dos bioinseticidas e suspensão de esporo/cristal

Foram utilizadas 16 isolados de *B. thuringiensis*, estocados no Laboratório de Processos Biotecnológicos, UFPR, além de IPS-82, linhagem referência proveniente do Institut Pasteur, Paris. Para a reativação e fermentação dos micro-organismos, concentração de  $2,0$  a  $5,0 \times 10^5$  UFC/ml foi inoculada a *Erlenmeyers* com 50 mL de meio Luria Bertani (SAMBROOK, 1989), que permaneceu em incubadora rotativa a 8 g e 30°C por 48 h.

Para os testes com *P. redivivus*, foi preparada suspensão de cristal/esporos a qual era adicionado à solução de nematóides. O meio fermentado era centrifugado a 500 xg por 15 minutos, tendo o sobrenadante descartado. O pellet resultante era ressuspenso com solução de *Phosphate buffered saline* (PBS – 8 g de NaCl, 0,2 g

de KCl, 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) até completar o mesmo volume do sobrenadante descartado.

## 2. Bioensaios

Os testes *in vivo* com as três espécies foram realizados em duas fases: a primeira de triagem da cepa com maior potencial larvicida ou nematicida e a segunda para determinação das concentrações letais 50% e 90% ( $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$ ). Na primeira fase, os testes foram feitos em triplicata com apenas uma diluição de bioinseticida fermentando. Na segunda fase, os testes foram novamente em triplicata e em quatro e cinco diluições diferentes do produto.

### 2.1 *A. aegypti*

Nos bioensaios com *A. aegypti*, na primeira parte, empregou-se a diluição de  $1\text{g.L}^{-1}$ , com 100  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana adicionada ao recipiente plástico com 20 larvas de 3º instar em 100 mL de água desclorada. Após 24 horas, realizou-se a contagem do número de larvas mortas para o cálculo da mortalidade. Caso a mortalidade dos potes que não recebiam o produto fosse igual ou superior a 20%, os testes eram anulados e refeitos. Os valores de mortalidade eram corrigidos pela fórmula de ABBOTT (1925).

---

#### **Fórmula de Abbott (1925)**

$$\text{Mortalidade de larvas (\%)} = 100 \cdot (X - Y) / X$$

---

Onde x = % de larvas vivas no controle; y = % de larvas vivas no tratamento

---

Na segunda etapa, o isolado que obtivesse o resultado mais significativo de mortalidade seria aplicado em cinco diluições diferentes ( $5\mu\text{L.L}^{-1}$ ,  $10\mu\text{L.L}^{-1}$ ,  $12,5\mu\text{L.L}^{-1}$ ,  $15\mu\text{L.L}^{-1}$  e  $25\mu\text{L.L}^{-1}$ ) nas mesmas condições da fase anterior. Os resultados seriam usados para o cálculo de  $\text{DL}_{50}$  e  $\text{DL}_{90}$  dos produtos fermentados com as cepas de maior toxicidade ao *A. aegypti*.

## 2.2 *Duponchelia fovealis*

Nos testes com a lagarta de *Duponchelia fovealis*, a primeira etapa seguiu a técnica descrita por SILVA et al. (2004) em placas de cultivo celular de 24 poços, os quais recebiam ração e 1 lagarta de segundo instar. O volume de 35 µl do produto fermentado era aplicado à superfície do alimento, onde, após secagem por alguns minutos em estufa a 50°C, recebia uma lagarta que permanecia por 48 h incubada. Após esse período, era feita a contagem de lagartas vivas e transferência à outra placa com ração livre do produto. As lagartas permaneciam por 5 dias ainda nessas placas, ao término era feita a contagem de sobreviventes e determinação da taxa de mortalidade do organismo frente ao produto. A segunda etapa seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, apenas variando a dose do produto adicionado com a cepa de melhor desempenho na primeira parte. Foram adicionados à ração 5, 20, 35 e 50 µl em 24 indivíduos em 24 poços da placa para cada diluição. Ao término dos sete dias de experimento, era realizada a contagem das lagartas vivas e determinação da taxa de mortalidade. Paralelamente às duas fases, uma placa de 24 poços sem a adição do produto funcionava como controle negativo.

## *Panagrellus redivivus*

Nos testes com *Panagrellus redivivus*, a primeira etapa seguiu a técnica descrita por NAVON & ASCHER (2000), onde 50 µl da suspensão cristal/espores de *Bacillus thuringiensis* foi adicionada a 50 µl da cultura de nematóides, com aproximadamente 20 indivíduos. Os experimentos foram feitos em placas de 96 poços e o controle negativo consistiu da solução de PBS no lugar da suspensão espora/cristal. Após 24 h, era feita a contagem de indivíduos vivos, cuja diferença em relação ao número médio de nematóides vivos no controle negativo, permitia o cálculo da mortalidade. O isolado que produzisse taxa de mortalidade superior a 50% seria selecionado para a etapa subsequente, que seguia a mesma metodologia descrita anteriormente, porém, empregando diferentes diluições da solução espora/cristal: 5, 20, 50, 70 e 100 µl.

## Teste estatístico

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos com os três organismos utilizados foram submetidos ao teste de ANOVA com grau de significância de 95%.

Dessa forma, foram verificadas diferenças significantes no desempenho dos bioinseticidas fermentados com cada uma das cepas bacterianas.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As taxas de mortalidade obtidas na primeira fase do experimento foram transformadas para arcoseno, submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ambas ao nível de 5% de probabilidade de erro. A estimativa da  $CL_{50}$ , e dos intervalos de confiança (95%) foram obtidas pelo método de Trimmed Spearman-Kärber, com auxílio do programa computacional TSK, versão 1.5 (USEPA, 1990).

### 3. SDS-PAGE

A composição do complexo esporo/cristal foi analisada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%, seguindo a técnica de LAEMMLI (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para a retirada do excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. Como referencial de peso molecular, utilizou-se o marcador Broad molecular weight standards - Bio Rad.

### 4. Extração do DNA e amplificação por RAPD

O meio Luria Bertani (LB) foi preparado e inoculado com a cepa do *B. thuringiensis*, permanecendo em incubadora rotativa a 120 rpm, 30°C por 48 h. Ao término, 1 mL do meio de cultivo foi centrifugado em *eppendorf* a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo recebeu 300 µL da solução de Chelex® 100. O *eppendorf* foi submetido a 3 ciclos de um minuto de agitação em vórtex e, em seguida, permaneceu em banho-maria por 30 minutos. Após esse período, o material foi submetido à nova etapa de agitação em vórtex e seguiu para uma nova etapa de centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao fim, o DNA foi cuidadosamente aspirado com micropipeta no sobrenadante do tubo.

As amplificações em RAPD utilizaram sete primers descritos por SADDER et al. (2006) que evidenciam o polimorfismo em *B. thuringiensis* (Tabela 3). A reação de amplificação foi realizada com volume final de 25 µL contendo 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,4 IM de primer, 200 IM

dNTPs, 1U de Taq polimerase e 10 ng de DNA genômico. A amplificação ocorreu em termociclador Icyler programado com uma etapa de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C para desnaturação por 1 minuto, 35°C para anelamento por um minuto, 72°C de extensão por 2 minutos, e extensão final por 6 minutos. Os produtos das amplificações foram transferidos a um gel de agarose a 1,2% e submetidos à corrente de 70mV. Revelados numa solução de brometo de etídio, os géis eram visualizados em transiluminador Gibco BRL UV, fotografados e seguiam para a análise visual.

A interpretação do RAPD era feita com a transferência das informações do padrão de bandas para a construção de matrizes binárias, onde 1 significava presença e 0 ausência da banda. Os dados obtidos da interpretação dos sete géis foram inseridos no programa NTSYSpc2.1. Em seguida, a análise do *cluster* seguia através do cálculo pelo Coeficiente de Similaridade Genética de Jaccard, agrupado pelo método de UPGMA, e o programa construiu um dendrograma com as amplificações estudadas (SCHLÜTER & HARRIS, 2006).

## RESULTADOS

### Bioensaio com *Aedes aegypti*

Na primeira etapa dos testes com larvas de *A. aegypti*, observou-se taxa variável de mortalidade (Tabela 1). Onze isolados testados se mostraram inócuos ao culicídeo (BR-04, BR-07, BR-08, BR-10, BR-11, BR-12, BR-14, BR-15, BR-16, BR-17, BR-18) e quatro propiciaram mortalidades moderadas, inferiores a 50% (BR-02, BR-03, BR-09 e BR-13). O isolado nativo BR-01 propiciou a mortalidade significativamente mais elevada de larvas, superando a cepa padrão IPS-82, com 96,7% contra 81,7%. Na segunda etapa, cinco diluições permitiram a determinação da equação da reta e o cálculo da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para BR-01, que foram 11,76 µl.L<sup>-1</sup> e 21, 61 µl.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1).

### Bioensaio com *Duponchelia fovealis*

Com a lagarta de *D. fovealis*, os resultados de mortalidade da primeira etapa foram inferiores ao observado com *A. aegypti* (Tabela 1). A maioria das cepas produziu mortalidade igual ou inferior ao observado no controle negativo, tendo, portanto, a mortalidade zerada. Nesse caso se enquadraram 14 cepas (BR-01, BR-03 BR-04, BR-07, BR-08, BR-10, BR-11, BR-12, BR-14, BR-15, BR-16, BR-17, BR-



18 e IPS-82). Duas cepas atingiram mortalidades, BR-02 e BR-13, com 12,5 e 32,5%, respectivamente. Por fim, o isolado nativo BR-09 obteve o valor significativamente mais elevado de taxa de mortalidade, com 79,2%, habilitando-o para a segunda etapa dos bioensaios. Após os testes com quatro diluições, o valor de  $CL_{50}$  foi de  $13,74 \mu\text{L.L}^{-1}$  (Figura 2).

Tabela 1: Porcentagem de mortalidade das três espécies de organismos alvos com os isolados nativos do Paraná de *Bacillus thuringiensis* utilizados em bioensaios.

Isolados	<i>Aedes aegypti</i> <sup>1</sup>	<i>Duponchelia. fovealis</i> <sup>2</sup>	<i>Panagrellus. redivivus</i> <sup>3</sup>
BR-01	96,7	0	4,1
BR-02	21,7	12,5	0
BR-03	16,7	0	24,8
BR-04	0	0	55,9
BR-07	0	0	17,0
BR-08	0	0	17,0
BR-09	31,7	79,2	27,4
BR-10	0	0	9,3
BR-11	0	0	19,6
BR-12	0	0	53,3
BR-13	48,3	32,5	27,4
BR-14	0	0	0
BR-15	0	0	24,8
BR-16	0	0	0
BR-17	0	0	27,4
BR-18	0	0	19,6
IPS-82	81,7	0	1,5

<sup>1</sup> - Dose de  $1\text{g.L}^{-1}$

<sup>2</sup> - Dose de  $35 \mu\text{L.mL}^{-1}$

<sup>3</sup> - Dose de 50%

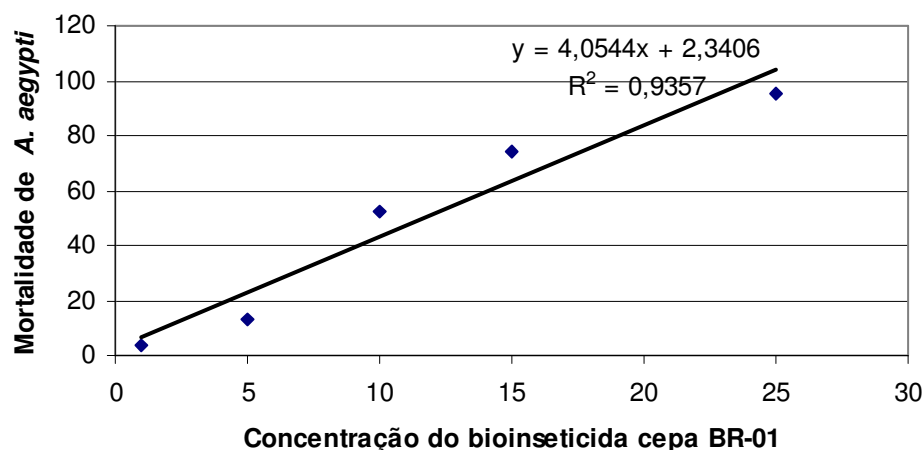


Figura 1: Mortalidade de *A. aegypti* conforme a concentração do fermentando de *B. thuringiensis*, cepa BR01.

#### Bioensaio com *Panagrellus redivivus*

Na primeira etapa dos testes envolvendo *P. redivivus*, os valores de mortalidade foram igualmente variáveis (Tabela 1). Seis cepas obtiveram resultado nulo ou inferior a 10% de mortalidade de nematóides (BR-01, BR-02, BR-10, BR-14, BR-16 e IPS-82). Nove isolados atingiram mortalidade entre 10 e 30% (BR-03, BR-07, BR-08, BR-09, BR-11, BR-13, BR-15, BR-17 e BR-18). Duas cepas superaram os 50% de mortalidade de nematóides, BR-04 e BR-12, que atingiram 55,9 e 53,3%, respectivamente. Na segunda etapa, a maior concentração testada, com 100 µl aplicado sobre a solução de nematóides, foram obtidas mortalidades de 95% e 70%. Após a segunda etapa, com ensaios em cinco concentrações do produto, o valor da  $DL_{50}$  do BR-04 foi 40,86 µl.L<sup>-1</sup> e BR-12 de 43,23 µl.L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

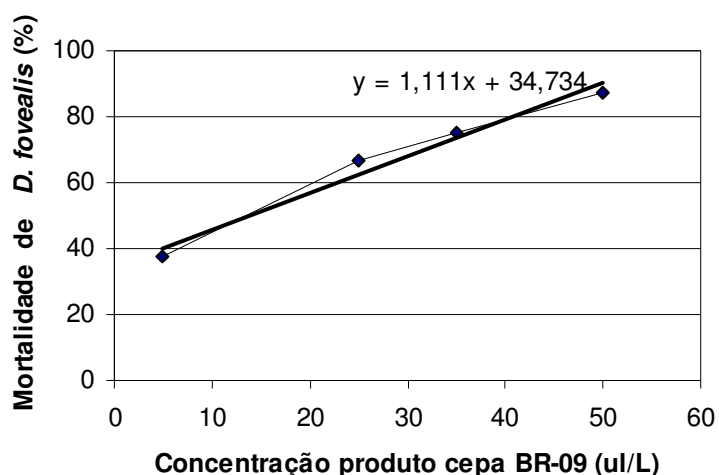


Figura 2: Mortalidade de lagartas de *D. fovealis* conforme a concentração do fermentado de *B. thuringiensis* produzido com a cepa BR-09.

Tabela 2. Dose letal (DL<sub>50</sub>) do extrato fermentado de duas cepas de *Bacillus thuringiensis* contra o nematóide de vida-livre *Panagrellus redivivus* após 24 horas. DL<sub>50</sub> estimada usando Trimmed Spearman-Kärber.

Cepa	Concentração(%)	Mortalidade (%)	Valores da DL <sub>50</sub> (%)	Limite de 95% de confiança (%)	Valor de TSK (%)
<b>BR-04</b>	9,1	20	40.86	28.78 - 58.0	20
	28,6	25			
	50	55			
	58,3	80			
	66,6	95			
<b>BR-12</b>	9,1	5	43.23	29.15 - 64.11	30
	28,6	50			
	50	55			
	58,3	60			
	66,6	70			

## SDS-PAGE

A análise dos perfis proteicos pela técnica de SDS-PAGE foi realizado com as cepas BR-01, BR-04, BR-09, BR-12 e IPS-82, isolados que propiciaram os resultados de mortalidade mais elevados contra as espécies testadas. Foram observados a presença de peptídeos variando entre 15 e 160 kDa, mas com diferenças na distribuição entre as cepas (Figura 3).

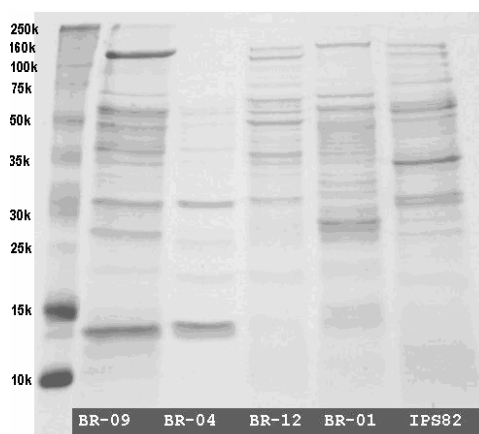


Figura 3: Perfil protéico por SDS-PAGE dos biopesticidas produzidos por BR-09, BR-04, BR-12, BR-01 e IPS-82

#### Amplificações aleatórias por RAPD

No total, 76 perfis polimórficos, entre 400 e 2000 pb, foram amplificados, demonstrando o potencial dos sete iniciadores testados para trabalhos com RAPD para a bactéria. O iniciador RAPD-18 formou o padrão mais numeroso de bandas no gel, com 14 (Figura 4), e o iniciados RAPD-01 produziu o menor números de fragmentos, 7 (Tabela 3). O Coeficiente de Similaridade Genética de Jaccard apresentou valores que variaram entre 9,1 e 92,7 (Tabela 4).

O dendrograma final (Figura 6), construído a partir da informação das amplificações aleatórias (Figura 5), posicionou as cepas de *B. thuringiensis* de acordo com o grau de semelhança dos fragmentos. Considerando os índices de similaridade próximos a 30,0, os 17 isolados testados se distribuíram em três clusters: o primeiro composto pelos isolados BR-01 e IPS-82, o segundo abrigando dez isolados (BR-02, BR-09, BR-10, BR-04, BR-08, BR-07, BR-14, BR-15, BR-16 e BR-17) e o terceiro composto por outros cinco isolados da bactéria isoladas no estado do Paraná (BR-03, BR-12, BR-13, BR-11 e BR-18).

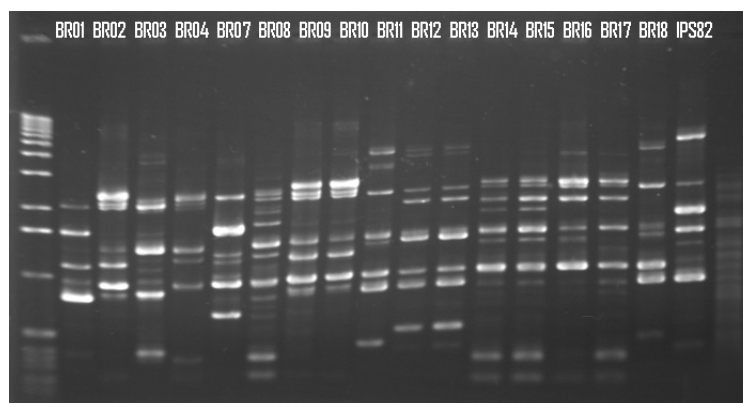


Figura 4: Perfil de bandas polimórficas do *B. thuringiensis* amplificadas com o primer RAPD-18 em gel de agarose 1,2% com os isolados BR-01, BR-02, BR-03, BR-04, BR-07, BR-08, BR-09, BR-10, BR-11, BR-12, BR-13, BR-14, BR-15, BR-16, BR-17 BR-18, IPS-82 e controle negativo.

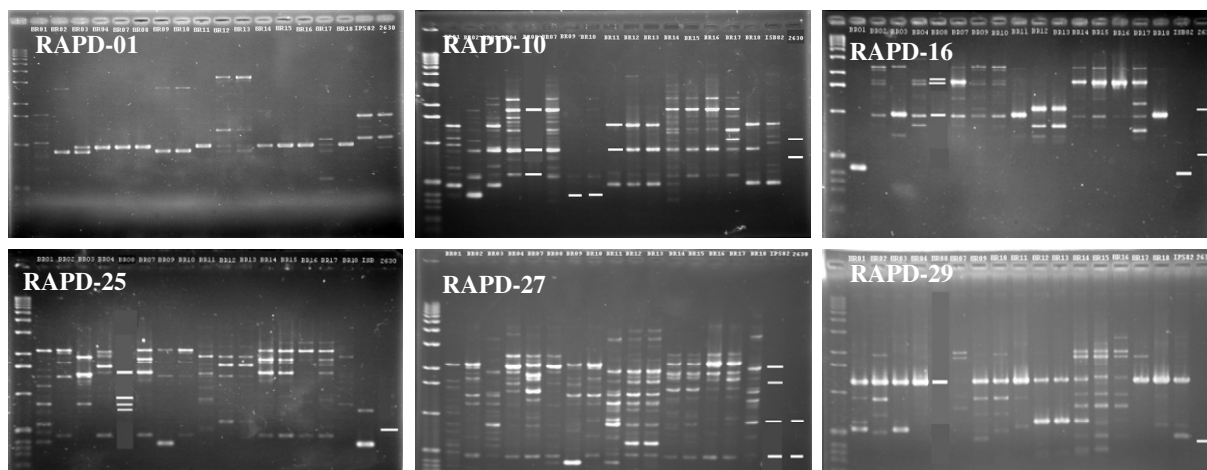


Figura 5: Géis das amplificações aleatórias por RAPD produzido com os primers RAPD-01, RAPD-10, RAPD-16, RAPD-25, RAPD-27 e RAPD-28 com os isolados BR-01, BR-02, BR-03, BR-04, BR-07, BR-08, BR-09, BR-10, BR-11, BR-12, BR-13, BR-14, BR-15, BR-16, BR-17 BR-18, IPS-82 e controle negativo.

Tabela 3: *Primers* decâmeros polimórficos (SADDER et al., 2005) e o correspondendo número de fragmentos amplificados.

Nome	Seqüência	Nº de perfis
RAPD-01	CAGGCCCTTC	7
RAPD-10	CAATCGCCGT	10
RAPD-16	GTCGCTCAGA	12
RAPD-18	TCATCGCGCT	14
RAPD-25	CAGCACCCAC	13
RAPD-27	GTGAGGCGTC	13
RAPD-29	GAACGGACTC	8

## DISCUSSÃO

Os bioensaios realizados com três espécies de organismos alvos atestaram a riqueza e diversidade de isolados de Bt presentes no solo. Embora os invertebrados testados tenham padrões de vida distintos, com habitat e tipos de alimentação diferentes, todos se mostraram susceptíveis a ao menos um isolado nativo de *B. thuringiensis*. Os resultados preliminares foram promissores e as mortalidades obtidas demonstram o potencial existente na pesquisa por novas cepas de Bt, aumentando o espectro de formulações disponíveis e produtos destinados ao controle biológico.

Outro fator constatado foi a especificidade bacteriana, tendo em vista que em todos os casos o isolado selecionado por produzir maior mortalidade a uma espécie não repetiu o mesmo desempenho nos testes com outro organismo. A toxicidade cruzada entre organismos de ordens diferentes já havia sido descartada por BENINTENDE et al. (1999), que afirmaram que elevadas toxicidades conseguem, no máximo, produzir eficiências moderadas em organismos de ordens diferentes. No presente trabalho, as duas situações foram observadas, com isolados extremamente restritos no raio de ação, como BR-01, e outras cepas mais generalistas, afetando ainda que moderadamente as três espécies, caso de BR-13.

Ainda tratando da especificidade, outro aspecto verificado foi que as cepas que geraram toxicidades às lagartas de *D. fovealis* também afetaram às larvas de *A. aegypti*, ainda que num menor grau. O BR-09, isolado nativo que apresentou o maior resultado significativo de mortalidade contra a lagarta, com 79,2%, ainda foi responsável por mortalidade moderada ao culicídeo, 31,7%. Esses resultados indicam que a endotoxina produzida pelo isolado nativo do Paraná poderia ter afinidade aos dois insetos alvos, entretanto, privilegiando a ação citotóxica na lagarta de *D. fovealis*. Semelhante resultado foi constatado por MARTÍNEZ et al. (2004), que verificaram elevada toxicidade a lagartas e mortalidades reduzidas a espécies de Culicidae. A explicação foi sugerida por BRAVO et al. (2007), que afirmaram que a presença de estruturas similares entre larvas de Lepidoptera e Culicidae resultaria em modos de ação similares.

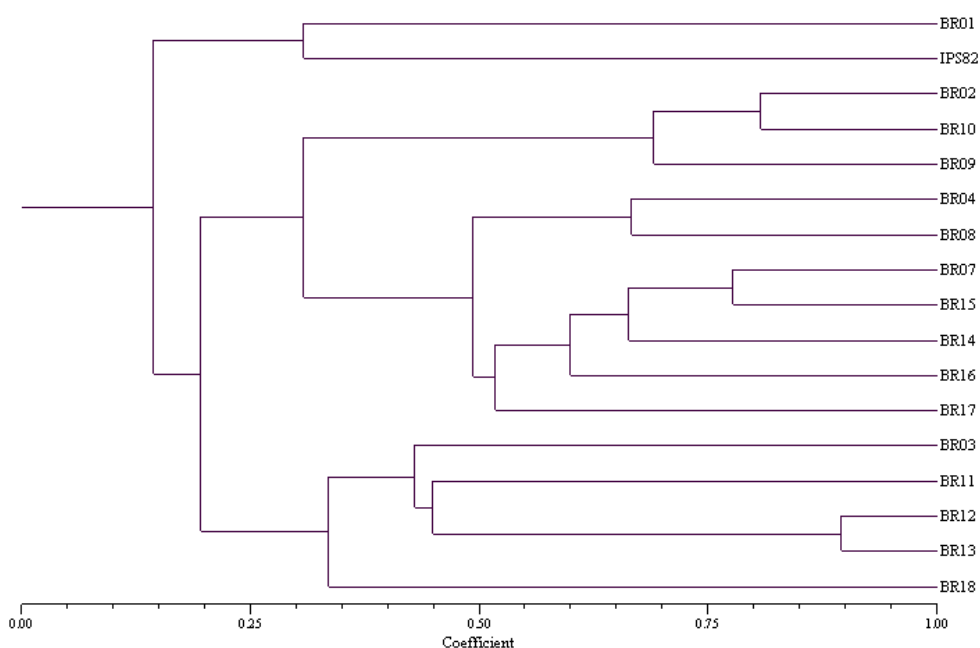


Figura 6: Dendrograma relacionando as 16 isolados nativos e um isolado referência de *B. thuringiensis* de acordo com coeficiente de similaridade de Jaccard dos produtos das amplificações de RAPD.

Semelhante fenômeno não foi observado com *Panagrellus redivivus*, cujas cepas que produziram as mortalidades mais elevadas do nematóide, BR-04 e BR-12, foram inócuas às fases larvárias de *A. aegypti* e *D. fovealis*. A especificidade observada, nesse caso, foi semelhante ao ocorrido com *Aedes aegypti*, cujas cepas de maior toxicidade tiveram espectro de ação limitado, não afetando os outros organismos testados. Essa característica de elevada especificidade pode tornar esses isolados candidatos potenciais à formulação de inseticidas biológicos, reforçando o aspecto de segurança ambiental por não afetar os demais organismos do meio.

A análise do SDS-PAGE auxiliou na compreensão de algumas características fenotípicas dos isolados de maior toxicidade. As cepas que produziram índices significativamente superiores de mortalidade de *A. aegypti*, BR-01 e IPS-82, apresentaram um perfil protéico que compartilharam peptídeos em comum no intervalo de peso molecular entre 50 kDa e 150 kDa (Figura 3). Por outro lado, as proteínas inferiores a 30 kDa se mostraram mais concentradas na cepa BR-01 e pouco evidentes em IPS-82. Contando com peso molecular de 28 kDa, a proteína Cyt é um dos principais componentes na ação tóxica do Bt, especialmente em

culicídeos, apresentando um efeito sinérgico que potencializa a ação tóxica da proteína Cry com peso superior a 100 kDa (FEDERICI et al. 2010). No presente trabalho, a ocorrência de maiores concentrações da proteína Cyt pode estar influenciando no resultado nos bioensaios com *A. aegypti*, que foram superiores na cepa nativa BR-01 em relação a linhagem referência de *B. thuringiensis*, IPS-82.

Tabela 4: Coeficiente de Similaridade Genética de Jaccard dos isolados de *B. thuringiensis* por RAPD.

	BR-01	BR-02	BR-03	BR-04	BR-07	BR-08	BR-09	BR-10	BR-11	BR-12	BR-13	BR-14	BR-15	BR-16	BR-17	BR-18
BR-02	21,0															
BR-03	23,5	23,1														
BR-04	12,2	30,0	33,3													
BR-07	9,1	35,0	22,0	50,0												
BR-08	11,4	28,6	32,2	66,7	51,6											
BR-09	23,5	60,0	29,4	26,3	21,9	28,1										
BR-10	20,0	71,4	29,4	33,3	25,0	32,3	76,0									
BR-11	7,9	14,6	38,7	30,6	19,5	29,0	19,4	19,4								
BR-12	9,5	19,0	41,2	23,8	14,9	21,6	17,1	21,0	42,4							
BR-13	7,3	16,3	39,4	25,0	15,6	22,9	15,0	17,9	45,2	92,7						
BR-14	18,2	36,6	28,6	46,1	66,7	45,7	28,6	35,0	20,4	13,7	16,7					
BR-15	17,4	39,5	30,2	50,0	77,1	47,2	33,3	32,0	19,6	15,4	16,0	88,6				
BR-16	15,8	45,5	31,4	51,5	57,6	53,6	35,3	48,4	18,4	16,3	17,1	61,1	70,6			
BR-17	17,1	35,0	31,6	54,3	55,6	51,6	28,2	38,9	22,5	20,0	20,9	50,0	55,0	62,5		
BR-18	15,1	15,8	29,0	22,2	17,9	19,3	11,1	11,1	44,4	25,7	27,3	21,9	20,9	13,5	15,0	
IPS-82	37,0	7,5	18,2	10,3	7,1	9,1	14,7	11,4	22,6	13,2	13,9	13,9	13,3	10,8	15,4	20,7

O perfil proteico do isolado BR-09, cepa com a maior eficiência contra a lagarta de *D. fovealis* apresentou variado espectro de proteínas entre 14 kDa e 150 kDa (figura s). BOBROWSKI et al. (2002), trabalhando com dois isolados de *B. thuringiensis* de elevada toxicidade às lagartas de *Anticarsia gemmatilis* observaram a presença de proteínas com 130 e 70 kDa, que correspondiam ao Cry 1 e Cry 2, variantes da endotoxina de elevada toxicidade a Lepidoptera. Semelhante padrão de perfil protéico foi detectado por SILVA et al. (2004), que estudaram três isolados de Bt em testes com diferentes ordens de insetos e verificaram o perfil protéico



semelhante ao encontrado em *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, com proteínas Cry 1 e Cry2.

Mais recentemente, MONNERAT et al. (2007), pesquisando isolados de *B. thuringiensis* com toxicidade a três espécies de lagartas, também verificaram bandas no perfil protéico de 70 a 130 kDa, indicando as proteínas Cry 1 e Cry 2. Estes dados corroboram com os obtidos nesta pesquisa, onde o desempenho de elevada toxicidade com a lagarta acompanhou a presença de bandas com pesos moleculares similares, visualizados por SDS-PAGE, o que pode indicar a presença das proteínas de elevada toxicidade a espécies de Lepidoptera.

A técnica de RAPD se mostrou como ferramenta útil no estudo do polimorfismo e determinação do índice de similaridade genética em *B. thuringiensis*. Neste trabalho, o coeficiente de similaridade de Jaccard (Tabela 4) demonstrou a diversidade nas amostras testadas. Da mesma forma, observa-se que as cepas nativas tenderam a apresentar maior semelhança entre si, com valores próximos ou superiores a 40,0. Por outro lado, o estudo dos coeficientes da cepa IPS-82 em relação às demais, observa-se decréscimo acentuado nesses índices, raramente atingindo 20,0. Dessa forma, pode-se notar a divergência genética existente entre IPS-82 e os isolados nativos. A única exceção foi a cepa BR-01, isolado que apresentou maior grau de similaridade com a linhagem referência, atingindo 37,0.

Uma explicação para esse fato foi proposta por VILAS-BÔAS & LEMOS (2004), que atribuíram a elevada diversidade genética do Bt a fatores ecológicos e ambientais, aproximando geneticamente estirpes de mesmo habitat. KUMAR et al. (2010) também associaram a proximidade geográfica do local de isolamento a maiores coeficientes de similaridade em amostras de Bt da Índia, indicando influência ambiental como estímulo das modificações genéticas. O mesmo parece ter ocorrido neste trabalho, com a maioria dos isolados provenientes do estado do Paraná atingindo graus de similaridade reduzidos em relação à cepa IPS82.

## CONCLUSÕES

A cepa BR-01 apresentou a maior toxicidade contra *Aedes aegypti*, atingindo mortalidade de 96,7% e valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 11,76  $\mu\text{L.L}^{-1}$  e 21,61  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , com perfil protéico de até 150 kDa.

A cepa BR-09 apresentou a maior toxicidade contra *Duponchelia fovealis*, atingindo 79,2% de mortalidade e CL<sub>50</sub> de 13,74 µl, com perfil protéico com proteínas entre 15 kDa e 150 kDa.

As cepas BR-04 e BR-12 apresentaram as maiores toxicidades contra *Panagrellus redivivus*, atingindo mortalidades de 95% e 70%, respectivamente, além de CL<sub>50</sub> de 37,30 µl.L<sup>-1</sup> e 42,77 µl.L<sup>-1</sup>. O perfil protéico revelou proteínas com pesos moleculares diferentes, inferiores a 60 kDa no primeiro caso, e com peptídeos de 150 kDa no segundo.

As amplificações aleatórias por RAPD demonstraram a diversidade genética dos isolados nativos de *B. thuringiensis*, com índices de similaridade reduzidos entre si e com a linhagem referência, IPS-82.

A diversidade genética, demonstrada por RAPD, é funcional, com o resultado dos bioensaios, demonstram o grande potencial verificado nos isolados nativos de *B. thuringiensis*, cujas aplicações podem abranger variados ramos do controle biológico, desde o controle de vetores ao combate a pragas agrícolas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265-267.

BAXTER S.W., BADENES-PÉREZ F.R., MORRISON A., VOGEL H., CRICKMORE N., KAIN W., WANG P., HECKEL D.G. & JIGGINS C.D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics* 189(2): 675-679.

BENINTENDE G., LÓPEZ-MEZA J., COZZI J., IBARRA J. (1999) Novel nontoxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Letters of Applied Microbiology* 29:151-5.

BOBROWSKI V.L., PASQUALI G., BODANESE-ZANETTINI M.H., PINTO L.M.N., FIÚZA L.M. (2002) Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biology. Control* 25: 129-135.

BRAVO A., GILL S. S., SOBERÓN M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.

BRODERICK N.A., ROBINSON C.J., McMAHON M.D., HOLT J., HANDELSMAN J., RAFFA K. (2009). Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis* induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology* 7(11): 1-9.

CARVALHO, M. A., SILVA, C. R. D., & NEGRI NETO, A. (2000). Exportações brasileiras de produtos agrícolas e mudanças na demanda mundial de alimentos. [CD ROM] In: XXVIII ENCONTRO NACIONAL DE ECONOMIA, Campinas: Anais.

EKOBU M., SOLERA M., KYAMANYWA S., MWANGA R.O., ODONGO B., GHISLAIN M. & MOAR W.J. (2010). Toxicity of seven *Bacillus thuringiensis* cry proteins against *Cylas puncticollis* and *Cylas brunneus* (Coleoptera: Brentidae) using a novel artificial diet. Journal of economic entomology 103(4): 1493-1502.

FABRIS C., OUÉDRAOGO R.K., COPPELLOTTI O., DABIRÉ R. K., DIABATÉ A., DI MARINO P., GUIDOLIN L., JORI G., LUCANTONI L., LUPIDI G., MARTENA V., SAWADOGO S.P., SONCINI M. & HABLUETZEL A. (2012) Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulate on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: a potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. Acta Tropica 123(3): 239-243.

FEDERICI B.A., PARK H.W. & BIDESHI D.K. (2010) Overview of the Basic of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. Open Toxinology Journal 3: 83-100.

FIUZA L.M., SCHUNEMANN R., PINTO L.M.N. & ZANETTINI, M.H.B. (2012) Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). Brazilian Journal of Biology 72(2): 363-369.

HU Y., GEORGHIOU S.B., KELLEHER A.J. & AROIAN R.V. (2010) *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. PLoS Neglected Tropical Diseases 4(3) e614.

KOVENDAN K., MURUGAN K., VINCENT S. & KAMALAKANNAN S. (2011). Larvicidal efficacy of *Jatropha curcas* and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against lymphatic filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Parasitology Research 109(5): 1251-1257.

KUMAR D., CHAUDHARY K. & BOORA K.S. (2010) Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. Indian Journal of Microbiology 50: 27-32.

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-685.

MARTÍNEZ C., PORCAR M., LÓPEZ A., RUIZ DE ESCUDERO I., PÉREZ-LLARENA F.J. & CABALLERO P. (2004) Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with broad spectrum of activity against lepidopteran insects. Entomology Experimental Applied 111: 71-77.

MONNERAT R.G., BATISTA A.C., MEDEIROS P.T., MARTINS E.S., MELATTI V.M., PRAÇA L.B., FIUZA V.D., MORINAGA C., DEMO C. & GOMES A.C.M. (2007) Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. Biology Control 41: 291-295.

NAVON A. & ASCHER K.R.S. (2000) Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI publishing, Wallingford, UK.

NIEDMANN L. & MEZA-BASSO L. (2006). Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick); Lepidoptera: Gelechiidae en Chile. Agricultura Técnica 66 (3): 235-246.

POOPATHI S. & ARCHANA B. (2012) A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for mosquito control. Tropical Biomedicine 29(1): 81-91.

RIVERA A.M.G. & PRIEST F.G. (2003) Molecular Typing of *Bacillus thuringiensis* Serovars by RAPD-PCR. Systematic Applied of Microbiology 26(2): 254–261.

SADDER M.T., KHYAMI-HORANI H. & AL-BANNA L. (2006) Application of RAPD technique to study polymorphism among *Bacillus thuringiensis* isolates from Jordan. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1307-1312.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHLÜTER M.P. & HARRIS A.S. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Molecular Ecology Notes 6 (2): 569-572.

SHA L., ZHANG T., HUANG Z.M., HUANG Z.P. & GUAN X. (2011) ICPs polymorphism of *Bacillus thuringiensis* BRC-HZP7. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 5.

SILVA S., SILVA-WERNECK J., FALCÃO R., GOMES A., FRAGOSO R., QUEZADO M., OLIVEIRA NETO O., AGUIAR J., GROSSI DE SÁ M.F., BRAVO A. & MONNERAT R. (2004) Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. Journal of Applied Entomology 128: 1–6.

USEPA (1990) Trimmed spearman-karber (TSK) program version 1.5 ecological monitoring research division. Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH.

VILAS-BÔAS G.T. & LEMOS M.V.F. (2004) Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. Canadian Journal of Microbiology 50(8): 605-613.

## CAPÍTULO 3

**Utilização da cama de frango em meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner para o controle de *Aedes aegypti* Linnaeus**

(Artigo publicado na revista *Journal of Biotechnology and Biodiversity*)

André Luiz de Almeida Melo, Carlos Eduardo Sanchuki, Adenise Lorenci  
Woiciechowski, Vanete Thomaz-Soccol e Carlos Ricardo Soccol

**ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) is one of the most important microorganisms used in bioinsecticide formulations. It has an application against insect vectors of several diseases. Despite his efficiency and environment safety, his use is limited by the production costs. All around the world, research have been performed to discovery materials that reduce the final costs of Bti insecticides. The present paper has tested the application of poultry litter as culture medium to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. The bioinsecticide was tested against thirty instar *Aedes aegypti* larvae and the performance has been compared with the waste cassava starch and citrus pulp media. The poultry litter has enabled the higher larvae mortality; it achieved 100% in 20 and 10mg.L<sup>-1</sup> concentrations and exceeded 50% in 5mg.L<sup>-1</sup>. The others materials have got significant lower performances. The waste cassava starch was useful only in 20mg.L<sup>-1</sup> concentration and falling in others values, and the citrus pulp medium has not reached 50% of larvae mortality even in the higher concentration (20mg.L<sup>-1</sup>). The chemical composition of poultry litter revealed the presence of 39% of nitrogen source and 4% of carbon source, beyond the higher concentrations of potassium and phosphorus.

**Keywords:** Culicidae, waste cassava starch, citrus pulp, fermentation medium, bioinsecticide

## INTRODUÇÃO

Presente em diversas partes do globo, os insetos da família Culicidae são responsáveis por uma série de danos e prejuízos à saúde humana. Por praticarem a hematofagia, esses insetos acabam funcionando como vetor de diversos agentes infecciosos, incluindo vírus, protozoários e helmintos. Dessa forma, o combate a esses culicídeos sempre foi considerada uma medida indispensável para o controle dessas doenças (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Por várias décadas, os inseticidas químicos ocuparam lugar de destaque nesse trabalho, sendo aplicados para a eliminação de larvas e adultos. Porém, com o passar do tempo, sua eficiência foi decrescendo com o surgimento de resistência dos insetos. Além disso, foram observados efeitos tóxicos da utilização desses produtos no ambiente (BRAGA et al., 2004).

Nesse contexto, a descoberta de bactérias produtoras de endotoxina com efeito entomopatogênico abriu uma nova perspectiva ao desenvolvimento de inseticidas e combate dos insetos vetores. A utilização desses bioinseticidas apresenta a vantagem de maior especificidade ao organismo alvo e, conseqüentemente, sendo ambientalmente seguros, não acumulando na cadeia trófica (KUMAR et al., 2000). O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram positiva de crescimento aeróbico, cujo cristal protéico apresenta uma grande toxicidade aos organismos alvo, isto é, culicídeos, coleópteros, lepidópteros, himenópteros ou nematódeos, dependendo da subespécie de *B. thuringiensis*.

O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é a subespécie mais amplamente utilizada nos programas de controle de dengue e febre amarela. Apresentam duas categorias de cristais, as proteínas Cry e Cyt, que apresentam uma elevada afinidade com larvas de *Aedes aegypti*. Uma vez ingeridas pela larva, os cristais são solubilizados e ativam células do trato digestivo, provocando lise seguida de morte da larva (POLANCZYK et al., 2003). Encontrado no solo naturalmente, o isolamento desse micro-organismo pode ser realizado através de técnicas simples, com meios seletivos, sendo realizado rotineiramente para o estudo de novas cepas patogênicas da bactéria (OOTANI et al., 2011).

Apesar do elevado potencial entomopatogênico do cristal protéico do Bti, o micro-organismo não possui grandes exigências fisiológicas para produzi-los e multiplicar-se em larga escala. Uma fonte comum de carbono e nitrogênio, além de

uma aeração adequada, é suficiente para produção de biomassa e toxinas de Bti (DULMAGE et al., 1990). Entretanto, a escolha da composição do meio de cultivo é de suma importância na produção do bioinseticida. O meio padrão para o micro-organismo é composto por substâncias sintéticas de alto valor agregado, elevando excessivamente o custo final do produto e inviabilizando sua produção. Sendo assim, a pesquisa por matérias-primas de baixo custo tem sido um desafio nas fermentações com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

A utilização de resíduos agrícolas tem sido bastante estudada para a produção de inseticidas biológicos. Diversos trabalhos já demonstraram o potencial existente nos subprodutos à base de soja, aveia, amendoim, trigo, feijão, entre outros (MELO et al., 2009; PRABAKARAN & BALARAMAN, 2006; ZOUARIN et al., 2002; EJIOFOR & OKAFOR, 1989). Tal prática se mostra eficiente na redução de custos, mas sua aplicação só tem efeito a nível local, usando matérias-primas disponíveis em cada região (DULMAGE et al., 1990).

Outra vertente dos trabalhos com fermentação de bioinseticidas utiliza resíduos em decomposição como matéria-prima para os meios de cultivo. Considerando a grande quantidade de matéria orgânica presente, os estudos com lodo foram iniciados. O material resultante de estações de tratamento se mostrou eficiente nas fermentações da bactéria, com produção de grande quantidade de células e ação entomopatogênica (MONTIEL et al., 2001). Apesar da necessidade de um pré-tratamento que neutralize e habilite o lodo para as fermentações, os autores obtiveram uma redução significativa nos custos com as fontes de carbono e nitrogênio.

Seguindo essa linha, a cama de frango, resíduo rico em matéria orgânica proveniente de aviários, tem demonstrado um grande potencial como base de meios de cultivo. Trabalhos recentes trazem resultados satisfatórios de fermentações de Bti com cama de frango quando comparado ao meio padrão para a bactéria (POOPATHI & ABIDHA, 2007). Apesar da grande disponibilidade desse material e da necessidade de produção de bioinseticidas de Bti, não existem estudos que verifiquem a aplicabilidade desse resíduo de aviários utilizando uma cepa de Bti nativa no Brasil.

O presente trabalho visou testar a utilização da cama de frango na fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e comparar o desempenho de mortalidade de larvas ao resultado produzido a partir da fermentação com outros

resíduos agrícolas, tais como bagaço de mandioca e a polpa cítrica. A cama de frango também foi analisada quimicamente para determinação da composição do substrato.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Micro-organismo**

A cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizada foi BR-01, isolada no estado do Paraná e mantida no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB-1), da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O micro-organismo foi estocado em nitrogênio líquido a -196°C com solução de glicerol 10%. Para o preparo dos pré-inóculos, o fermentado com meio LB (SAMBROOK et al., 1989) era dividido em alíquotas de 4 mL e mantida em freezer -4°C.

### **Cama de frango**

A coleta da cama de frango foi realizada em uma granja de frangos de corte no município de Mandirituba, estado do Paraná. Foram coletadas amostras de diferentes pontos de uma cama de frango de terceira geração, isto é, suporte que abrigou a terceira ninhada de animais. O material foi acondicionado em caixas de isopor com tampa vedada, garantido assim um ambiente livre de umidade e entrada de organismos.

### **Resíduos agroindustriais**

Foram testados dois resíduos agroindustriais associados à indústria alimentícia com elevados teores nutricionais; baixo custo e facilmente disponíveis no Paraná. Empregou-se o bagaço de mandioca, subproduto obtido da fabricação de polvilho, e a polpa cítrica, resíduo resultante da produção industrial de suco de laranja e seus derivados.

### **Elaboração dos meios e fermentações**

Os meios de cultivo eram formulados com o composto básico testado, isto é, cama de frango, bagaço de mandioca ou polpa cítrica, diluídos em água destilada



numa concentração de  $40\text{g.L}^{-1}$ . Após ajuste do pH para 7,0, os meios foram esterilizados a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm por 20 minutos.

O inóculo foi produzido em frasco Erlenmeyer com o meio Luria Bertani (SAMBROOK et al., 1989) e fermentado em incubadora rotativa a 120rpm e  $30^{\circ}\text{C}$ . Após 24h, um inóculo de  $2,0 - 4,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$  era adicionado aos meios testados. Os frascos permaneciam incubados por 72h e após esse período foram usados nos bioensaios.

#### Criação de *Aedes aegypti*

Os adultos da cepa Rockfeller de *Aedes aegypti* (Linnaeus) foram criados em gaiolas forradas com telas (25cm x 25cm) e acondicionados no interior de estufa com temperatura de  $26-30^{\circ}\text{C}$ . A alimentação foi feita com solução açucarada (sacarose) a 10% e os repastos sanguíneos ocorriam semanalmente utilizando camundongo neonatos.

A ovoposição foi feita em papéis filtro cortados imersos em recipientes de plástico com água. Os ovos eram separados e protegidos de calor e umidade. Para os bioensaios, os ovos eram mantidos em água destilada onde, posteriormente, ocorriam a eclosão das larvas. Essas eram mantidas em estufa e alimentadas com a ração Alcon (Goldfish).

#### Bioensaio

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições com 20 larvas. As variáveis estudadas foram: tipo de substrato (cama de frango, bagaço de mandioca e polpa cítrica) e concentração aplicada do bioinseticida (20, 10 e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os testes foram realizados em recipientes de plástico com 10cm de altura e 10cm de diâmetro, contendo 20 larvas de 4<sup>o</sup> instar de *A. aegypti* em 90ml de água. O volume foi completado para 100ml com a adição de 10ml do produto fermentado diluído em água nas concentrações desejadas. Além dos potes que recebiam a solução bacteriana, outros três funcionavam como controle negativo, isto é, sem receber qualquer dosagem do produto. Após 24h era feita a análise, com a contagem das larvas mortas. A taxa de mortalidade foi calculada e corrigida com a fórmula de ABBOTT (1925). Caso fosse observada uma mortalidade superior a 20% no grupo controle, o bioensaio era invalidado. Para a

análise dos resultados, empregou-se o teste t Student para cada substrato testado. Todos os tratamentos seguiram um intervalo de confiança de 95%,  $\alpha = 0.05$ .

---

*Fórmula de Abbott (1925)*

---

$$\text{Mortalidade de larvas (\%)} = 100 \cdot (X - Y) / X$$


---

x = % de larvas vivas no controle; y = % de larvas vivas no tratamento

---

#### Testes analíticos de composição

A relação carbono e nitrogênio da cama de frango foi realizada em triplicata através do analisador elementar Flash 2000 da Thermo Scientific. As amostras foram transformadas em um fino pó, após uma secagem de 24h a 60 °C e moídas. Em seguida, eram pesadas em balança analítica específica, entre 2 e 3 mg das amostras e levadas para a análise. Os resultados foram obtidos em porcentagem de cada elemento e a relação C/N calculada através da divisão dos teores de C pelos teores de N.

A quantificação do Fósforo ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) solúvel em água foi realizada em triplicata pelo método colorimétrico com azul molibdênio, utilizada para solos, plantas e agrotóxicos (Silva, 1999). A determinação do  $\text{K}^+$  solúvel em água foi realizada através do cromatógrafo de íons Compac IC 761 com detector Bioscan 817 da Metrohm. Os resultados foram obtidos em mg de  $\text{K}^+$  por ml de amostra e convertidos em mg de  $\text{K}^+$  por g de massa seca do composto.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as três formulações testadas, o meio de cultivo composto por cama de frango obteve a maior taxa de mortalidade de larvas (figura 1). Essa composição possibilitou 100% de eficiência nas duas primeiras diluições (20 e 10mg.L<sup>-1</sup>), alcançando 55% na concentração de 5mg.L<sup>-1</sup>. Esse resultado foi significativamente maior que o obtido pelo meio com bagaço de mandioca, que teve 100% em 20mg.L<sup>-1</sup>, 65% em 10mg.L<sup>-1</sup> e 20% em 5mg.L<sup>-1</sup>. Quando comparado com o produto de polpa cítrica, que obteve 30 e 14% nas diluições de 20 e 10mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, além de não ter eficiência na concentração de 5mg.L<sup>-1</sup>.

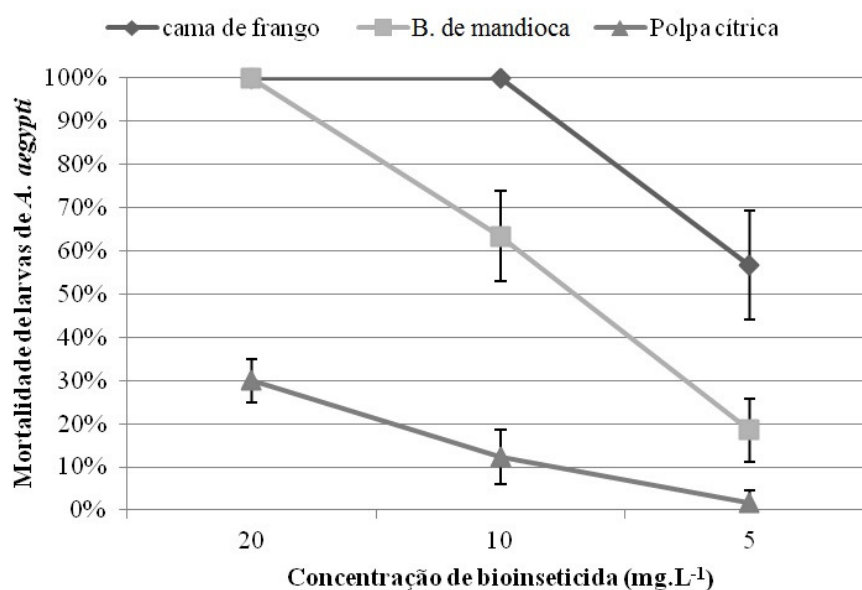


Figura 1: Porcentagem de mortalidade de larvas L3 de *Aedes aegypti* produzida pelas diferentes formulações do bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner (Bti) após 24 horas.

Quantitativamente, a cama de frango apresentou elevadas taxas de carbono, obtendo 39,61% da composição, revelando-se uma rica fonte desse nutriente (Tabela 1). Compostos nitrogenados também se fazem presentes, mas dessa vez em menor quantidade, representando 4,00% da composição final. Outros nutrientes verificados em uma taxa elevada foram os sais, sobretudo potássio e fósforo, ingredientes não tão usados rotineiramente na composição de meios de cultivo bacteriano.

TABELA 1: Composição química de cama de frango

	Média
Nitrogênio (%)	4,00
Carbono (%)	39,61
Relação C/N	9,9
Potássio mg.g <sup>-1</sup> de peso seco	17,23
Fósforo mg.g <sup>-1</sup> de peso seco	1,31

Dentre os meios testados, a composição que recebeu polpa cítrica propiciou uma menor mortalidade de larvas, indicando menor sucesso na fermentação. Segundo RODRIGUES et al. (2011), a polpa cítrica é um substrato complexo com teores consideráveis de nitrogênio e, principalmente, carbono. Sua utilização mostrou-se eficiente como substrato e suporte para fermentações no estado sólido para fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*. Por outro lado, a quantidade de carbono descrita para polpa cítrica foi inferior ao obtido com a cama de frango, 19 e 39%, respectivamente. Essa diferença pode ter sido determinante para o sucesso da fermentação e produção de cristal protéico com a cama de frango, pois, quanto à fonte de nitrogênio, os dois substratos disponibilizam quantidades muito semelhantes, 4% na cama de frango e 5% na polpa cítrica.

Quanto ao meio de cultivo com bagaço de mandioca, diferenças na composição não existem, porém, a mortalidade de larvas foi inferior ao observado com o meio de cama de frango. No bagaço de mandioca, a fonte de carbono não é um limitante à fermentação, esse substrato disponibiliza, inclusive, uma quantidade ainda maior, 65% contra 39% obtida na cama de frango. Contudo, o decréscimo na eficiência do bioinseticida pode ser explicado pela baixa quantidade de nitrogênio disponível no meio, resultando numa fermentação menos produtiva. A polpa cítrica possui apenas 0,24% desse nutriente essencial (VANDENBERGHE et al., 2000).

O resultado de mortalidade propiciado pelo meio de cultivo com a cama de frango indicou uma multiplicação bacteriana satisfatória e consequente elevada produção de endotoxina, quando comparado às demais formulações testadas. Dentre os motivos para tal diferença, a composição dos meios de cultivo pareceu ser determinante. A utilização desse substrato tem se mostrado bastante propícia ao crescimento bacteriano devido ao balanço existente entre as fontes de carbono e nitrogênio. Na cama de frango podemos encontrar uma grande variedade de compostos orgânicos, provenientes dos restos alimentares das aves e do seu próprio metabolismo (SAVITHA et al., 2007). Esse complexo meio de cultivo, contendo elevados teores de fibras, queratinas e proteínas insolúveis, pareceu favorecer a multiplicação e produção de toxinas entomopatogênicas.

O bom desempenho nos bioensaios laboratoriais com *Aedes aegypti* indica a viabilidade da utilização da cama de frango como substrato para a produção do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, cepa BR-01. Esse desempenho poderia ter

sido ainda mais elevado com um tratamento prévio do substrato, como verificaram OZCANA et al. (2010), que se utilizaram de hidrólises ácidas para pré-tratar o material. Tais resultados atestam o potencial da cama de frango no cultivo do Bti e potencial desse substrato na formulação de um bioinseticida.

## CONCLUSÃO

A cama de frango pode ser usada para a produção do bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, cepa BR-01, com elevada entomopatogenicidade a *Aedes aegypti*, sendo superior ao obtido com o produto produzido com bagaço de mandioca e polpa cítrica.

## RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é um dos principais micro-organismos utilizados na formulação de bioinseticidas, possuindo grande aplicação no combate a insetos vetores de diversas doenças humanas. Apesar de eficiente e ambientalmente seguro, sua utilização ainda é limitada pelos custos de produção. Em todo mundo, pesquisas têm sido feitas em busca de matérias-primas que reduzam o custo final dos inseticidas de Bti. O presente trabalho testou a aplicação da cama de frango na composição do meio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. O bioinseticida resultante foi testado contra larvas L3 de *Aedes aegypti* e teve seu resultado comparado com os bioinseticidas produzidos com bagaço de mandioca e polpa cítrica. O meio com cama de frango possibilitou uma maior mortalidade de larvas, alcançando 100% nas diluições de 20 e 10mg.L<sup>-1</sup> e ultrapassando 50% em 5mg.L<sup>-1</sup>. Os demais resíduos obtiveram resultados significativamente inferiores. O bagaço de mandioca foi efetivo apenas na diluição de 20mg.L<sup>-1</sup>, caindo nas demais concentrações, e a polpa cítrica sequer atingiu 50% de mortalidade na maior concentração do produto. A composição química da cama de frango revelou a presença de 39% de fonte de carbono e 4% de fonte de nitrogênio, além de elevadas concentrações de sais de potássio e fósforo.

**Palavras-chave:** Culicidae, bagaço de mandioca, polpa cítrica, meio de fermentação, bioinseticida

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267, 1925.

BRAGA I.A., LIMA J.B.P., SOARES S.S.& VALLE D. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(2): 199-203, 2004.

CONSOLI R.A.G.B.& OLIVEIRA R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

DULMAGE H.T., YOUSTEN A.A., SINGER S., LACEY L.A.& LAWRENCE, A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. WHO, Geneva, 1990.

EJIOFOR A.O.& OKAFOR N. Production of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on raw material media from Nigeria. *Journal of Applied Microbiology* 67: 5-9, 1989.

KUMAR A., SRA K., SANGODKAR U.M.X.& SHARNA V.P. Advances in the bio-control of mosquito vector utilizing *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* var. *israelensis*. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences India* 70:1-20, 2000.

MELO A.L.A, SOCCOL C.R., THOMAZ-SOCCOL V., NOGUEIRA Jr M. Evaluation of *Bacillus sphaericus* bioinseticide produced with white soybean meal as culture medium for the control of *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus*. *Cadernos de Saúde Pública* 25(3):561-569, 2009.

MONTIEL M.L.T., TYAGI R.D.& VALERO J.R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research* 35(16): 3807-3816, 2001.

OOTANI, M.A.; RAMOS, A.C.C.; AZEVEDO, E.B.; GARCIA, B.O.; SANTOS, S.F.; AGUIAR, R.W.S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus, (Díptera: Culicidae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2: 37-42, 2011.

OZCANA O., ICGENB G.& OZCENGLIZ G. Pretreatment of poultry litter improves *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides production. *Bioresource Technology* 101(7) 2401-2404, 2010.

POLANCZYR R.A., GARCIA M.O.& ALVES S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública* 37: 813-816, 2003.

POOPATHI S.& ABIDHA S. Use of feather-based culture media for the production of mosquitocidal bacteria. *Biological Control* 43(1): 49-55, 2007.

PRABAKARAN G.& BALAKARAN K. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Biological Control 36(3): 288-292, 2006.

RODRIGUES C., ROSSI S.C., SPIER M.R., VANDENBERGHE L.P, SOCCOL V.T.& SOCCOL C.R. Citric pulp and sub-products of citric juice industry used as substrates in bioprocesses. In: Carlos Ricardo Soccol, Ashok Pandey, Vanete Thomaz Soccol, Christian Larroche. (Org.). Advances in bioprocesses in food industry. 1<sup>a</sup> ed. New Delhi: Asiatech Publishers Inc. 1: 121-135, 2011.

SAMBROOK J.E., FRITSCH F.& MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SAVITHA G.J., TEIASHWINI M.M., REVATI N., SRIDEVI R.& ROMA D. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. International Journal of Poultry Science 6(9): 689-693, 2007.

SILVA F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa, 1999.

VANDENBERGHE L.P.S., SOCCOL C.R., PANDEY A.& LEBEAULT J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid *Aspergillus niger*. Bioresource Technology 74(2): 175-178, 2000.

ZOUARI N., ACHOUR O.& JAOUA, S. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm<sup>3</sup> fermenters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 77(8): 877-882, 2002.

**CAPÍTULO 4*****Bacillus thuringiensis*: mecanismo de ação, resistência e novas aplicações**

*(Submetido à revista Critical Reviews in Biotechnology)*

André Luiz de Almeida Melo, Vanete Thomaz-Soccol e Carlos Ricardo Soccol

**ABSTRACT**

Since the first report by Ishiwatta (1902) in *Bombyx mori* infected and description by Berliner in 1915, *Bacillus thuringiensis* (Bt) has become the main microorganism used in biological control. Its application to combat invertebrates of human interest gained momentum with the growing demand for food free of chemical pesticides and implementing a less damaging to the environment. However, the mechanisms of action of these products have not been fully elucidated, but there are two proposed models: the first with the osmotic imbalance in response to formation of pores in the membrane and the second with the opening of ion channels activated by a process of death cell. The resistance to Bt has also been recorded by different ways: changes in the receptors that do not recognize Cry toxin, for the synthesis of membrane transporters that eliminate the peptides from the cytosol, or by regulatory mechanisms that disrupt the production of the toxin receptors. Besides the potential in the formulation of biopesticides and use to develop genetically modified cultivars, recent studies with Bt discuss promising applications in other branches of science. The production of chitinases, enzymes that degrade chitin, has aroused interest in the industry considering that this polymer is extremely abundant in nature. Another promising field is the study of Bt proteins acting against cancer cells. Functioning selectively, toxins that have not entomopathogenic effect, called parasporins, have cytotoxic effect on changed cells by some cancers. These results demonstrate the potential of the microorganism and the new opportunities opening up for future applications.

**Key-words:** Cry toxin, apoptosis, pore-forming, chitinase, cancer.



## INTRODUÇÃO

O primeiro registro de *Bacillus thuringiensis* (Bt) coube a Ishiwatta (1902), que observou o micro-organismo infectando *Bombyx mori* e causando prejuízos na indústria da seda do Japão no início do século XX (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992). Naquela época o autor nomeou o bacilo como sendo da espécie "*sotto*", que significa mole e flácido em referência ao aspecto da larva infectada. Posteriormente, Berliner na cidade de Thuringia (Alemanha) isolou uma bactéria Gram positiva em larvas da mariposa *Ephestia kuhniella* e, desconhecendo o trabalho de Ishiwatta, denominou-a como *Bacillus thuringiensis* (Bt). Por ter feito a descrição completa e demonstrando a infectividade experimentalmente através da ingestão dos esporos, a nomenclatura de Berliner persistiu e é usada até os dias atuais.

Mesmo que Berliner tenha provado o efeito tóxico repetindo o ciclo da ingestão à morte do inseto, o autor não atribuiu aplicabilidade do Bt no controle anti-larvário pois naquela época pouco se conhecia das características e do potencial da bactéria (CÔTÉ, 2007). O micro-organismo foi novamente isolado por Mattes em 1927, sendo usada nos anos seguintes para o controle biológico de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992). O surgimento da primeira formulação do bioinseticida de Bt surgiu na década seguinte, com o Sporeine, aplicada no controle de espécies de lepidópteros que afetavam lavouras na França (MILNER, 1994). Desde então, o espectro de organismos suscetíveis foi ampliado, englobando também as ordens Culicidae, Coleoptera, Simuliidae, Hymenoptera, Homoptera, Mallophaga, entre outras (SANCHIS, 2012). Posteriormente, como o advento da biologia molecular, os cristais tóxicos de Bt tiveram seus genes inseridos aos cultivares de interesse humano, tornando os vegetais geneticamente modificados refratários a diversas pragas agrícolas (ROH et al., 2007).

Apesar do Bt ter suas potencialidades exploradas há bastante tempo no controle de pragas, na produção plantas geneticamente modificados e no combate de vetores de interesse humano, as pesquisas com o micro-organismo ainda estão longe de se esgotar. Todos os anos novas abordagens do estudo da bactéria são realizados abrindo caminho para diferentes aplicações em variados ramos (DASH et al., 2013; KROEGER et al., 2013; ERNANDES et al., 2012; TAN et al., 2010; EL-NAGDI et al., 2009). A presente revisão abordará às recentes descobertas

envolvendo o mecanismo de ação do Bt, o estudo da resistência à toxina, o seu manejo da resistência e atualizar sobre os estudos com novas aplicações da bactéria, como a produção de quitinases e a ação tóxica em células cancerígenas.

## 1. MECANISMO DE AÇÃO DO *Bacillus thuringiensis*

Embora os produtos derivados do Bt sejam utilizados com sucesso no controle de um número elevado de invertebrados, os mecanismos que desencadeiam a citotoxicidade não foram completamente desvendadas. Se por um lado a cada dia o isolamento de novas cepas bacterianas é feito em diferentes locais e os testes *in vivo* atestam a suscetibilidade de diferentes espécies, os estudos que desvendam os eventos que resultam na morte celular não avançam na mesma velocidade. Atualmente, o que se conhece provém de levantamentos isolados, empregando uma determinada cepa de Bt no combate a uma espécie específica, normalmente lepidópteros de interesse agrícola (COOPER et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1997; JURAT-FUENTES & ADANG, 2006). Na análise desses estudos pode-se notar que mecanismos variados estão atuando, indicando que não existiria um único modelo padrão para a toxicidade causada pelo Bt. Além disso, os processos poderiam ocorrer simultaneamente, dificultando a compreensão e demonstrando que ainda há lacunas no conhecimento sobre a  $\delta$ -endotoxina, os receptores na membrana plasmática e a sequência de reações que culminam na morte do organismo.

### 1.1. Modelo de ligação Sequencial

Conhecido como o mecanismo clássico e extensivamente detalhado por diversos autores nos últimos anos (SOBERÓN et al., 2010; PARDO-LÓPEZ et al., 2009; BRAVO et al., 2007), o modelo de ligação sequencial atribuiu a ação citotóxica do *B. thuringiensis* aos danos causados pelo desequilíbrio osmótico da célula como resultado da formação de poros na membrana plasmática (Figura 1). Detalhado principalmente nos trabalhos com Cry1Ab em *Manduca sexta*, uma vez que a  $\delta$ -endotoxina é ingerida e ativada por proteases digestivas, as toxinas Cry entram em contato com receptores N-aminopeptidases e caderinas na superfície da membrana (JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2008; HUA et al., 2004; DORSCH et al., 2002) (Figura 1a). Afinidades moleculares específicas culminam na ligação entre toxinas e

receptores que acarretaria numa clivagem proteolítica em Cry, provocando modificações estruturais na cadeia formando oligômeros que funcionariam como "pré-poros" (Figura 1b e 1c). Em seguida, ocorreria uma terceira ligação na superfície da membrana, dessa vez com receptores N-aminopeptidases que, por apresentaram uma afinidade molecular, atuariam ancorando o pré-poro na bicamada lipídica (Figura 1d). Dessa forma, o poro formado afetaria a integridade da membrana (Figura 1e) e consequente perda de função, desequilibrando a célula osmoticamente levando-a à morte.

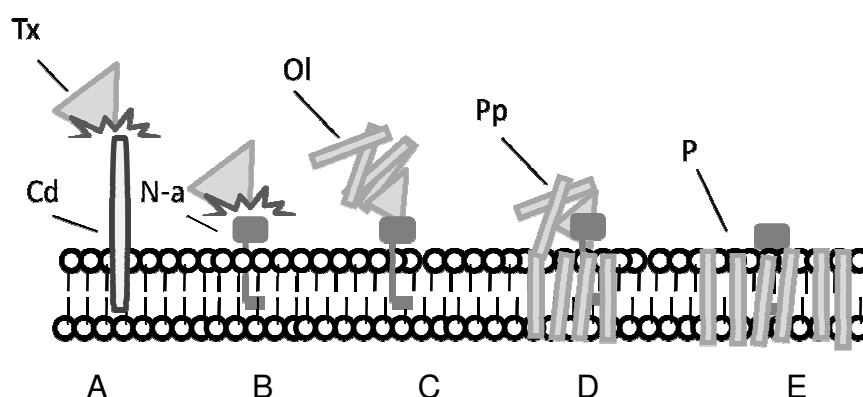


Figura 1: Mecanismo de ação da toxina Cry de Bt, modelo de ligação sequencial. A- Toxina Cry (Tx) se liga a receptores caderina (Cd) na membrana plasmática; B- Ligação do Cry com receptores N-aminopeptidase (N-a); C- Clivagem proteolítica da proteína por oligomerização (Ol); D- Formação do pré-poro e ancoramento na membrana; E- Poros (P) afetando integridade da membrana.

O modelo de ligação sequencial valoriza as ligações entre toxinas e receptores, alterando molecularmente a proteína e desencadeando a citotoxicidade no organismo suscetível pela formação de poros. O modelo é embasado por casos de resistência descritos, quando modificações na estrutura dos receptores inviabiliza a citotoxicidade, porém, não explica alguns tipos de resistência, quando a tolerância é verificada sem que exista qualquer alteração na estrutura dos receptores (VACHON et al., 2012). Da mesma forma, o silenciamento do RNA de caderinas e N-aminopeptidases desencadearam resistência do Cry, corroborando para a importância desses componentes na atividade biológica do Bt (SCHWARTZ et al., 1997). Contudo, a expressão de apenas um desses receptores heterólogos, caderina ou N-aminopeptidase, é suficiente para tornar a célula novamente sensível a várias toxinas do tipo Cry1A (FABRICK et al., 2009). O que demonstra que o

modelo na prática pode assumir rotas alternativas que não seguem estritamente o padrão levantado.

Outro ponto delicado na teoria está na formação do pré-poro, quando ocorreria uma clivagem da  $\alpha$ -hélice da proteína bacteriana. Em experimentos observa-se que a taxa de formação de poros não é influenciada pela atividade de proteases, isto é, o estímulo à clivagem das toxinas não afeta diretamente na formação dos poros, como se esperaria que ocorresse no intestino médio das lagartas (BAXTER et al., 2005; GÓMEZ et al., 2002). Além disso, mesmo com a clivagem dos sítios envolvidos na remoção da  $\alpha$ -hélice, o que inibiria formação de pré-poros, verifica-se que o processo continua ocorrendo, porém de forma mais lenta. Levantamento indica que a proteólise excessiva do Cry 1Ab dificultou a formação de poros (LEBEL et al., 2009), o que demonstrou a necessidade de um balanço para as reações sucessivas do modelo de ligação sequencial ocorram e formem poros na membrana celular.

## 1.2. Modelo de via de sinalização

O segundo mecanismo proposto possui semelhanças com o modelo anterior, contudo atribuindo a morte celular a outra causa. De acordo com essa teoria, as proteínas Cry afetariam a célula de duas formas, a primeira de maneira lítica, formando poros na membrana como proposto no modelo de ligação sequencial, e a segunda produzindo sucessivas reações que alteram o metabolismo celular (SCHWARTZ & LAPRADE, 2000; ZHANG et al., 2005) (Figura 2). Enquanto na visão anterior a formação de poros seria determinante no resultado final da ação tóxica, neste modelo a importância da incorporação do pré-poro na bicamada lipídica é minimizada, pois não seria suficiente para causar a morte celular (ZHUANG et al., 2002). Além disso, em alguns casos as toxinas bacterianas simplesmente não se unem a membrana e não acoplariam os pré-poros, embora a citotoxicidade ocorra da mesma forma. De acordo com essa hipótese, as toxinas Cry se ligariam a receptores caderinas e N-aminopeptidases (Figura 2a) que, através de processos não conhecidos, transmitiriam estímulos que resultariam na ativação dos canais de  $Mg^{2+}$  na membrana plasmática (Figura 2b). A abertura desses canais provocaria um movimento anormal de íons no citosol (Figura 2c). Muito mais do que um evento em decorrência da destruição de membrana plasmática, as toxinas bacterianas ativariam processos celulares pré-existentes, utilizados pela célula durante a

apoptose (ZHUANG et al., 2005). Segundo esse modelo, a forma lítica com a inserção de oligômeros na bicamada lipídica até ocorreria, contudo sem que pudesse resultar em qualquer função citotóxica.

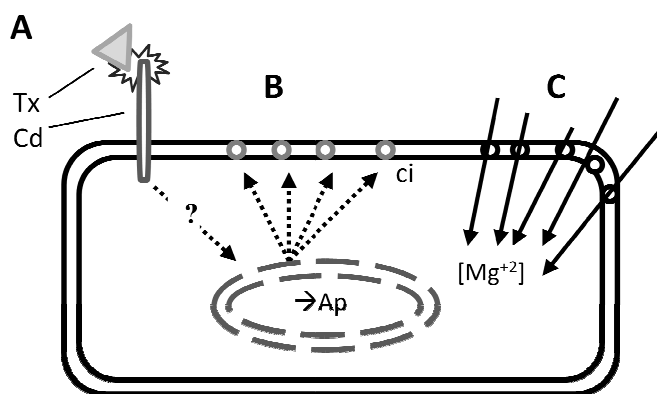


Figura 2: Mecanismo de ação da toxina Cry do Bt, modelo de via de sinalização: A- Toxina Cry (Tx) se ligando a receptores caderina (Cd) na membrana plasmática; B- Estímulo à apoptose (Ap) com ativação de canais iônicos (ci) na membrana plasmática; C- Entrada de íons magnésio culminando na morte celular.

A análise do modelo de via de sinalização aponta para grandes lacunas na compreensão dos mecanismo de ação. Simplificando o longo processo de ativação da toxina e seus receptores, o modelo negligencia uma extensa bibliografia e estudo disponível sobre a  $\delta$ -endotoxina, proteína Cry e receptores da membrana (VACHON et al., 2012). Testes *in vitro* e *in vivo* também alcançaram sucesso na permeabilização de membranas, demonstrando sucesso na formação de poros na membrana íntegra, mesmo assim a via de sinalização analisa os fatos sobre outra perspectiva. A ligação entre toxinas e receptores não seriam tão importantes na formação de poros, mas na ativação de processos de necrose celular envolvendo canais de íons. Estudos anteriores chegaram a associar a proteína Cry a ativação de canais de  $Ca^{2+}$ , demonstrando permeabilização e efeito intracelular de sinalização (PÉREZ et al., 2007; RAUSELL et al., 2004). Contudo, a hipótese da participação de íons na toxicidade do Bt não foi suficientemente explorada em comparação com o modelo de ligação sequencial.

Embora os modelos que tentem explicar o mecanismo das toxinas Cry sirvam como base para trabalhos práticos, tais levantamentos carecem de comprovação experimental. A via de sinalização é de difícil sustentação por ignorar um extenso

material levantado de pesquisas de receptores e ligações durante o processamento da  $\delta$ -endotoxina, minimizando a importância da cascata de eventos que envolve a atividade da toxina (ZHANG et al., 2005). O modelo de ligação sequencial fornece um padrão dos processos que se seguem durante a ligação da toxina e receptores, contudo ainda se mostra insuficiente em elucidar o mecanismo de ação tendo em vista a grande variação de rotas metabólica que podem culminar na morte da célula suscetível ou na resistência (VACHON et al., 2012). Ao que os fatos indicam, tanto fenômenos de formação de poros com permeabilização de membrana e ativação de canais com influxo iônicos podem estar presentes nos mecanismos da proteína Cry, sendo duas vias não excludentes.

## 2. RESISTÊNCIA

Os primeiros relatos de baixa toxicidade por resistência aos inseticidas de Bt começaram a ser notificados no início da década de 90. No primeiro deles, lagartas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera Plutellidae) apresentaram resistência ao Dipel 2X Abbott (Laboratories North Chicago, OL), umas das primeiras formulações comerciais de Bt, produzida com a cepa HD-01 (Côté, 2007). Posteriormente, essa reação foi caracterizada como reação de "modo 1", que engloba um determinado padrão de resistências (HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al., 2012). Primeiramente, no modo 1 existe uma elevada resistência a ao menos um subtipo da proteína Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab ou Cry1Ac) e baixa resistência ao Cry1C. Essa característica selecionada por lepidópteros resistentes é definida por um gene autossômico e apresenta herança recessiva. Além dessa descoberta, verificou-se a ocorrência de resistência cruzada, quando a tolerância a uma determinada toxina Cry possibilita o desenvolvimento de resistência à outra variante, como ocorre com resistência a Cry1A que implica na resistência ao Cry1F (TAN et al., 2013).

Nos anos que se seguiram, os relatos de resistência começaram a surgir em várias partes do globo envolvendo inseticidas de Bt e principalmente cultivares geneticamente modificados com variantes da toxina Cry. PEREZ et al. (1997) confirmaram através de testes em folhas de milho a resistência de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) a uma formulação de Bt em países da América Central, como Guatemala, Honduras e Costa Rica. FARINÓS et al. (2004) observaram o desenvolvimento de resistência em *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) e

*Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em lavouras de milho transgênico da Espanha. Já KRANTHI et al. (2006), estudando lavouras de algodão transgênico da Índia, constaram que a resistência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) era uma herança autossômica semi-dominante monogênica. Também estudando essa praga em lavouras de algodão transgênico, MAHON et al. (2007) verificaram a presença de dois genes autossômicos que conferiam resistência na Austrália. KRUGER et al. (2011) também observaram resistência de *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) em lavouras de milho transgênico com o Cry2Ab na África do Sul.

O estudo dos mecanismos que determinam a resistência dos insetos à toxina Cry ganhou impulso com a implementação dos cultivares geneticamente modificados, quando a melhor compreensão se tornou vital para uma lavoura protegida com elevada produtividade (TABASHNIK et al., 2008). Sendo assim, a partir do ano 2000, observou-se um grande esforço para elucidar a resistência ao Bt a nível molecular, como vários trabalhos sendo produzidos (MORIN et al., 2003). Dentre as formas de resistência, três vias podem ser destacadas: falha no reconhecimento de caderinas, síntese de transportadores de membrana e mecanismo trans-regulatório (Tabela 1).

Tabela 1: Estratégias dos organismos resistentes para tolerar a presença da toxina Cry de inseticidas biológicos de Bt e cultivares geneticamente modificados.

<b>Formas de resistência</b>	<b>Modo de ação</b>	<b>Causa</b>
Modificação nos receptores tipo caderina	Alteração nas caderinas resulta em não ativação pela toxina Cry	Mutação no gene da caderina gera modificação no sítio de ligação
Transportadores de membrana	Estrutura presente na membrana plasmática realiza transporte ativo da toxina para fora do citosol	Genes para a resistência ao Cry1Ac incluem transportadores ABCC2
Mecanismo Trans-regulatório	Alteração na expressão das aminopeptidases APN1 e APN6 inibe ação do Cry1Ac	Enquanto APN1 sofre down-regulation, APN-6 é up-regulated

## 2.1. Modificação nos receptores caderina

Em um dos primeiros trabalhos moleculares com receptores da toxina de Bt, MORIN et al. (2003) verificaram a existência de três alelos que codificam receptores caderinas relacionados a resistência ao Cry1Ac. Estudando populações resistentes de *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) que afetavam lavouras de algodão, os autores relataram que a presença de dois alelos mutados resultaria em lagartas resistentes à toxina Cry, enquanto um ou dois alelos normais gerariam lagartas suscetíveis, determinando caráter recessivo para a característica. O estudo revelou que os três alelos alterados produziam uma caderina com uma deleção de oito aminoácidos na estrutura quaternária do receptor. Ocorrendo exatamente nos sítios de ligação com o Cry1Ac, tal modificação impedia o reconhecimento e acoplamento da toxina, o que inviabilizava toda cascata de eventos que resultam na morte celular. O receptor caderina também ocupou a posição central na toxicidade de Cry1Ac para ZHANG et al. (2005). Estudando a toxina de Bt em *Manduca sexta* (Lepidoptera Sphingidae), os autores relataram a atividade da toxina dependendo da presença da caderina BT-R<sub>1</sub>. A retirada ou modificação do receptor na superfície da membrana tornava o organismo resistente ao Cry1Ac, da mesma forma que a adição do BT-R<sub>1</sub> devolveria a suscetibilidade. CHEN et al. (2009) também chegaram a um receptor caderina como o responsável pela ação citotóxica de proteínas Cry11Aa produzido por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Por meio de imunoenaios, os autores ligaram anticorpos marcados às caderinas e localizaram um grande número desses receptores nas membranas do ceco apical e distal das larvas, exatamente nos locais onde ocorre ação da toxina. Atualmente acredita-se que a caderina é o principal mediador da citotoxicidade por Bt em lepidópteros (ZHANG et al., 2005).

## 2.2. Síntese de transportadores de membrana

Outra via de resistência às toxinas de Bt decorre de genes que sintetizam elementos na membrana, mas desta vez teria a participação de transportadores ABCC2. Esses transportadores normalmente estão associados à resistência a drogas em células eucarióticas, transportando os compostos para fora do citosol. GAHAN et al. (2010) pesquisaram a resistência de *Heliothis virescens*, que afetava lavouras de algodão, ao Cry1Ac. Atuando sobre as caderinas, os testes *in vitro* indicavam a presença de ligação do receptor, contudo testes em campo apontavam



resistência. Por fim, através de análise genética observou-se a existência de transportadores de membrana ABCC2, que estavam minimizando a ação da toxina do Bt. Também após um extenso mapeamento genético, BAXTER et al. (2011) estudaram a resistência de *Plutella xylostella* (Lepidoptera Plutellidae) e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera Noctuidae) ao Cry1Ac e verificaram a presença de genes dos transportadores ABCC2. Localizado no cromossomo 15, os autores detectaram a presença de cinco genes para resistência no mesmo locus, entre eles o dessa estrutura de membrana. O transportador teria um papel crucial na resistência da célula às toxinas, retirando de forma ativa a toxina do citosol e inibindo a ação citotóxica do Cry1Ac. Semelhante resultado foi verificado em HERNANDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2012), que também verificaram genes da resistência que abrigava um transportador ABCC2, auxiliando na resistência de *P. xylostella*, mas dessa vez com o variante Cry1Fa.

### 2.3. Mecanismo trans-regulatório

Diferentemente dos outros trabalhos citados, no modelo proposto por TIEWSIRI et al. (2011) não houve mutações nos receptores com perda de função ou transportadores de membrana que expulsam a toxina do citosol. Avaliando uma população resistente de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera Noctuidae), os autores verificaram o chamado mecanismo trans-regulatório. Dois receptores N-aminopeptidases, APN1 e APN6, produzidos na mesma proporção na célula suscetível, tiveram seu balanço regulatório alterado. Enquanto a produção de APN1 era reduzida significativamente, APN6 tinha a sua produção aumentada. Essa alteração impediu a atividade da toxina o que resultou na inatividade citotóxica e resistência. Os motivos que explicam o desequilíbrio não são claros, mas acredita-se que apenas APN1 teve sua síntese diminuída e APN6 aumentou como um mecanismo compensatório. Independente disso, modificações no mecanismo trans-regulatório podem inibir a atividade do Cry1Ac sem que precise ocorrer qualquer alteração nas estruturas receptoras.

### 2.4. Manejo da resistência

Com o passar dos anos, os registros de resistência dos insetos foram se tornando cada vez mais numerosos tanto para inseticidas de Bt e até para plantas transgênicas com a toxina Cry. Passou-se a adotar a estratégia piramidal, quando os

cultivares recebem o material genético de duas toxinas diferentes, o que diminuiria a chance de sobrevivência dos organismos resistentes. Exatamente essa estratégia foi adotada por cultivares de algodão afetado por espécies de lepidópteros. Inicialmente os genes que produziam Cry1Ac eram adicionados a planta, em seguida foi inserido o gene para Cry2Ab. Essa estratégia de prevenção ao desenvolvimento da resistência seria eficiente porque envolve toxinas com sítios de ligação em regiões diferentes, o que evita a resistência cruzada. Porém, o que se observou na prática não foi exatamente o teorizado, demonstrando que o comportamento da resistência pode seguir padrões diferenciados. Estudando cultivares de algodão afetados por *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), TABASHNIK et al. (2009) descreveram o que foi chamado de resistência cruzada assimétrica. Os autores verificaram que os indivíduos com resistência ao Cry1Ac tinham elevada taxa de resistência também ao Cry2Ab. Por outro lado, o inverso não ocorria, quando a resistência ao Cry2Ab não produzia o mesmo efeito para Cry1Ac. Os autores sugerem que a resistência ao Cry1Ac provavelmente envolve dois ou mais loci no gene de resistência, enquanto que Cry2Ab exigiria apenas um locus, que também era compartilhado por Cry1Ac.

O surgimento da resistência dos insetos ao Bt tornou-se especialmente relevante nos cultivares transgênicos, sendo que desde então estratégias de manejo têm sido elaboradas que visem eliminar ou simplesmente reduzir sua incidência. Dentre essas metodologias, a utilização de áreas de refúgio tem sido bastante estudada no combate à resistência (CARRIÈRE et al., 2004; LENORMAND & RAYMOND, 1998). Por essa estratégia, os produtores deveriam destinar uma área de cultivo livre dos inseticidas de Bt ou cultivares transgênicos próxima a 20%. Nesse local, a diversidade de insetos sensíveis ao Cry seria mantida, o que evitaria a proliferação exagerada dos indivíduos resistentes a toxina usada na lavoura. Dessa forma, afirmavam os defensores dessa teoria, haveria redução da frequência dos alelos da resistência e prolongaria o tempo de eficiência da toxina (TABASHNIK et al., 2009). Apesar dessa prática ser praticada, a eficiência e os resultados permanecem sob discussão. Além das dificuldades na implementação, como a escassez de metodologias que oriente a implantação, a avaliação prática levanta dúvidas sobre a eficiência. CARRIÈRE et al. (2012) verificaram no mesmo estudo resultados divergentes, ou seja, determinados cultivares apresentaram a redução da frequência dos indivíduos resistentes, mas em outras culturas não foram observados

diferenças. Avaliando um grande número de propriedades e cultivares, os autores concluíram que a análise das condições espaciais de cada ambiente é importante na elaboração e implementação de refúgios, isto é, estudos amplos e criteriosos são necessários para o planejamento adequado dessas áreas de refúgio.

Assim como os mecanismos de ação do Bt podem variar e produzir respostas celulares diversificadas que culminam na morte celular, os invertebrados também utilizam múltiplas estratégias de escape à ação das toxinas. Apesar desse campo de pesquisar ser bastante recente, diferentes vias metabólicas da resistência foram detectadas e provavelmente muitas outras ainda serão descritas com processos celulares que resultem na resistência ao Bt. O estudo e melhor compreensão desses mecanismos são indispensáveis na elaboração de estratégias de manejo da resistência e assegurando a efetividade dos inseticidas biológicos e cultivares geneticamente modificados.

### **3. OUTRAS APLICAÇÕES DO BT**

Prestes a completar um século desde a descrição detalhada de Berliner, o Bt se tornou uma importante ferramenta no controle de pragas que afetam o homem, seja na agricultura como no combate de vetores. Desde o primeiro uso comercial das formulações de Bt para o controle de lagartas, o espectro de aplicações aumentou não se restringindo apenas a função inicial. Simultaneamente percebeu-se que as potencialidades do Bt vão além do controle biológico, tendo sido foco de interesse de outros ramos da ciência de interesse humano.

#### **3.1. PRODUÇÃO DE QUITINASES**

Quitinases são enzimas que degradam a quitina, um polissacarídeo formado por polímeros amplamente distribuído na natureza. Essa enzima pode ser encontrada nas paredes celulares de fungos, exoesqueleto de artrópodes, carapaças de crustáceos, nematóides, entre outros (DAHIYA et al., 2006). Quimicamente as quitinases atuam hidrolisando as cadeias N-acetil D-glicosamina e por essa capacidade se tornaram de grande interesse da indústria. Pela afinidade ao polímero e atividade degradante, as quitinases possuem inúmeras aplicações, desde associadas à saúde, como ação antibacteriana e imunomoduladora, e na agricultura,

com substâncias anti-fúngicas e controle de patógenos de plantas (BHATTACHARYA et al., 2007; REYES-RAMÍREZ et al., 2004).

A presença de enzimas quitinases no Bt foi constatada recentemente, após muitas décadas de uso de campo. Geralmente era atribuído um papel secundário na citotoxicidade dos inseticidas biológicos, acreditou-se desde então que a ação tóxica era atribuída quase exclusivamente às toxinas Cry. Porém, recentemente trabalhos têm mudado essa visão, dando a devida importância às quitinases na atividade biológica da bactéria (WIWAT et al., 2000; SAMPSON & GOODAY, 1998). Sabe-se que as quitinases atuam de forma sinérgica ao Cry, propiciando incremento nas taxas de mortalidade (LIU et al., 2002). Essas enzimas atuam rompendo o exoesqueleto quitinoso do organismo, auxiliando na invasão da bactéria nos tecidos internos e no estabelecimento da septicemia que antecede a morte do invertebrado.

Segundo VU et al. (2009), que utilizaram meios de cultivo com elevada produção de quitinases, mesmo com um menor número de células bacterianas e uma concentração inferior de esporos, foram obtidos resultados de toxicidade significativamente superiores em relação ao alcançado pelo meio de cultivo que produzia quitinases em menor concentração. RAMÍREZ-SUERO et al. (2011) chegaram a calcular o efeito sinérgico das quitinases na toxicidade de alguns isolados de Bt em testes de mortalidade com *A. aegypti*, atingindo fatores de sinergismo entre 2 e 1,4, evidenciando a importância dessas enzimas na atividade biológica da bactéria.

A partir do momento que a produção de quitinases provou proporcionar um efeito benéfico ao bioinseticida de Bt elevando a toxicidade em ensaios biológicos, alguns autores se preocuparam em estimular a produção dessas enzimas durante a produção do bioinseticida (BRAR et al., 2008; DAHIYA et al., 2006). Para tanto, é necessário a adição de quitina no meio de cultivo, estimulando a bactéria a secretar as quitinases para degradar o substrato, que se acumularia no sobrenadante durante a fermentação. Em alguns casos, quando o objetivo principal é a produção da enzima, pode-se utilizar a quitina como única fonte de carbono disponível no meio. Em outros trabalhos, quando a toxicidade é a meta, ocorre apenas a suplementação do meio de cultivo com o polímero (WANG et al., 2006; VU et al., 2009).

Apesar da produção de quitinases ainda não ser a preocupação central dos trabalhos com formulações para meios de Bt, em muitos casos o estímulo a

produção da enzima ocorreu de forma indireta, principalmente no emprego de substratos complexos. CHAIHARN et al. (2013) obtiveram resultados satisfatórios de toxicidade empregando resíduos de camarão, que incluem o exoesqueleto quitinoso, na formulação do meio de cultivo para Bt. Da mesma forma, PATIL et al. (2013) fermentaram a bactéria e obtiveram resultados elevados de mortalidade utilizando um meio de cultivo formado a partir do exoesqueleto do bicho da seda, que possui valores próximos a 75% de massa seca de quitina. No meio de cultivo de cama de frango descrito por MELO et al. (2011), a adição de quitina ocorreu de maneira indireta, quando o apanhado de serragem e cepilho, presente no meio de cultivo, recebia a adição de excretas das aves e coleópteros nos estágio adulto e larvário que ali viviam e enriqueciam o substrato. Nos três casos, a quitina presente nos meios de cultivo provavelmente estimulou a produção de quitinase que incrementou a ação das toxinas Cry produzidas pelo Bt.

Embora as quitinases atuem de forma benéfica no aumento da toxicidade dos produtos de Bt, a utilização nos bioinseticidas é apenas uma das potencialidades dessas enzimas, cuja aplicação na indústria ultrapassa os limites do controle de pragas. Trabalhado com sementes de soja, REYES-RAMÍREZ et al. (2004) verificaram a atividade anti-fúngica das quitinases de Bt atuam de forma protetiva. Sério problema na agricultura, os fungos reduzem o potencial germinativo das sementes inibindo o seu desenvolvimento, tornando a procura por substâncias que protejam as sementes um desafio. Nesse trabalho, os autores trataram as sementes com quitinases do Bt e inocularam-na com esporos de fungos. Foram obtidas taxas de germinação de até 93% de sementes de soja contaminadas com o fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc, atestando o efeito degradante das quitinases sobre as paredes do fungo.

Avaliando as quitinases produzidas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki* produzidas com efluentes de lodo de esgoto, BRAR et al. (2008) verificaram a presenças de quitinases com pesos moleculares variando de 36 a 45 kDa, analisados por SDS-PAGE. Nos meios empregados, os autores observaram que os picos de produção das enzimas ocorriam entre 15-30 h de fermentação, mantendo uma taxa de atividade de 96-99% após duas semanas incubadas com temperatura controlada e pH 4,0. Esses trabalhos de caracterização são imprescindíveis para o aproveitamento dessas enzimas e demonstram o potencial na produção das quitinases através de fermentações com meios alternativos com Bt.

Esses estudos indicam que a preocupação com a produção de quitinases é uma importante variável na toxicidade dos produtos de Bt. Enquanto por muito tempo o objetivo exclusivo das fermentações com Bt era a produção de esporos e toxinas Cry, a importância da produção da enzima que incrementa a eficiência dessas formulações deveria ser outro parâmetro a ser levado em consideração. Além disso, a produção de quitinases pode abrir outra vertente da aplicação do Bt, incluindo o controle de fungos que são organismos naturalmente não suscetíveis à toxina Cry.

### 3.2. ATIVIDADE DO BT CONTRA O CÂNCER

As propriedades entomopatogênicas do Bt são conhecidas e extensamente aplicadas, porém, é importante lembrar que a maioria das estirpes da bactéria não apresenta essa propriedade, sendo inócuas aos invertebrados (OHBA et al., 1998). Apesar de produzirem toxinas e eliminá-las durante a esporulação, não é observado atividade biológica ou dano citopático sobre os organismos testados. Por muito tempo esse fato intrigou os cientistas, que começaram a testar possíveis aplicações para o conteúdo protéico dessas estirpes não tóxicas, até que MIZUKI et al. (1999) fizeram uma surpreendente observação. Os autores relataram uma nova categoria de proteínas do Bt com pesos moleculares inferiores ao Cry e que, embora não causassem dano citopático no epitélio intestinal dos invertebrados, apresentavam toxicidade quando expostas a células alteradas de alguns tipos de câncer.

Essas toxinas com pesos moleculares inferiores a 90 kDa foram denominadas parasporinas, peptídeos que apresentavam efeito tóxico em células cancerígenas de forma discriminatória, isto é, que afetam apenas células alteradas, não causando danos em células normais. Até o presente momento, quatro formas de parasporinas foram descritas, PS-1, PS-2, PS-3 e PS-4 (Tabela 2), tendo suas atividades biológicas ainda estudadas e não totalmente elucidadas (WANG et al., 2006). Uma característica comum a todas parasporinas é a necessidade de sofrer ativação com a clivagem da terminação N da proteína, para se tornarem biologicamente ativas. Esse procedimento pode ser comparada à ativação das toxinas entomopatogênicas, que necessitam sofrer ação das proteases digestivas no ambiente alcalino do

intestino médio dos invertebrados para que possam desencadear o dano citopático. Laboratorialmente esse processo pode ser feito enzimaticamente com o tratamento com proteinase K e tripsina em pH alcalino, ou seguindo outras metodologias.

Dentre as parasporinas, duas são as mais estudadas (PS-1 e PS-2). A PS-1 teve a atividade documentado por KATAYAMA et al. (2005), que observaram diferentes graus de citotoxicidade em quatro linhagens de células derivadas de tecidos cancerosos, com destaque para HeLa, formado por células de carcinoma cervical humano, que apresentou elevada suscetibilidade a toxina ativada. POORMINA et al. (2010) pesquisaram cepas de Bt que produziam parasporina-1 tóxicas para células de câncer de cólon (HCT-250) e linfoma (U-937) de um total de 82 isolados nativos da bactéria. Por fim, obtiveram um isolado com alta citotoxicidade para o primeiro tipo de célula alterada e moderado para o segundo. NAGAMATSU et al. (2010) analisaram o dano citopático em células de câncer hepático (HepG2) e carcinoma cervical (HeLa) causado por PS-1 e verificaram alterações morfológicas evidentes como inchaço celular e vacúolos no citoplasma, semelhantes ao observado durante a apoptose.

Tabela 2: Tipos de parasporinas conhecidas, suas atividades biológicas e a referência.

<i><b>Parasporina</b></i>	<i><b>Modo de ação citotóxica</b></i>	<i><b>Linhagem vulnerável</b></i>	<i><b>Tipo de câncer</b></i>	<i><b>Referência</b></i>
PS-1	Indução da apoptose e $\uparrow [Ca^{+2}]$	HeLa HCT-250	Carcinoma cervical	Katayama et al. 2005
			Câncer de colon	Poormina et al. 2010
PS-2	Formação de poros e desequilíbrio osmótico	HepG2	Câncer hepático	Kitada et al. 2006
		HeLa	Carcinoma Cervical	Akiba et al. 2009
PS-3	Não investigado	HL60	Leucemia mielóide	Yamashita et al. 2005
		HepG2	Câncer hepático	
PS-4	Formação de poros e desequilíbrio osmótico	Molt-4	Leucemia	Okumura et al. 2011
		CACO-2	linfoblástica	
		Sawano	Câncer aderente colon	
			Carcinoma endometrial	

O dano citopático também foi estudado por KITADA et al. (2006), mas com PS-2 em células de câncer hepático (HepG2). Esses autores verificaram alterações no citoesqueleto, fragmentação de mitocôndrias e retículo endoplasmático, além do aumento anormal da permeabilidade celular. ABE et al. (2008), estudando a PS-2 com a mesma linhagem de células hepáticas, verificaram a oligomerização da proteína formando poros que se ligavam aos lipídeos da membrana plasmática. AKIBA et al. (2009) analisaram estruturalmente a formação dos poros na membrana plasmática pesquisando HepG2 recebendo um extrato com PS-2. Os autores verificaram a presença de três domínios, o primeiro responsável pela ligação e os dois últimos com a formação do poro.

YAMASHITA et al. (2005) pesquisaram a atividade biológica de PS-3 aplicadas em 16 linhagens de células, incluindo 9 de tecidos cancerosos, 4 de tecidos humanos íntegros e 3 linhagens de células normais de outros mamíferos. Por fim, os autores comprovaram o efeito tóxico de PS-3 nas linhagens HL60 e HeLa, de leucemia mielóide e carcinoma cervical, respectivamente, contudo os mecanismos de citotoxicidade não foram investigados nesse estudo. Abordando a citotoxicidade de PS-4, OKUMURA et al. (2011) relataram a sua citotoxicidade nas linhagens CACO-2, Sawano e Molt-4, correspondente a células de câncer de colon, carcinoma endometrial e leucemia linfoblástica, respectivamente. Os autores verificaram alterações morfológicas típicas de stress osmótico, como células inchadas, com encolhimento de núcleo e que arrebentavam após 24h. Os autores verificaram a ligação dos poros na membrana plasmática formados através da ativação das moléculas de colesterol.

As parasporinas 1 e 2 foram o foco de estudo de OHBA et al. (2009), que verificaram modelos diferentes que resultam na morte celular das células alteradas. Na primeira delas, PS1a1, foi observado um rápido aumento das concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ , sem o aumento da permeabilidade na membrana. Para os autores, provavelmente a parasporina estaria ativando o mecanismo de apoptose da célula suscetível. Por outro lado, PS2a1 não atuaria no citoplasma, mas com o aumento da permeabilidade das membranas nas células cancerígenas levando ao desequilíbrio osmótico. Esse evento seria decorrente da ligação com o sítio receptor e oligomerização da toxina, formando pré-poros. Uma vez acopladas aos lipídeos da



bicamada, essas estruturas resultariam na perda de função da membrana e morte celular.

Ao que esses resultados indicamos mecanismo de ação das PS-1 e PS-2 se assemelham muito com os modelos existentes para a toxicidade às células do trato digestivo dos invertebrados. Assim como na ligação sequencial o dano celular era originado pela formação de poros e perda da integridade da membrana plasmática, PS-2 também formaria oligômeros que uma vez ligados aos lipídeos da membrana plasmática resultam em poros nas células cancerígenas, levando a célula à morte. Na via de sinalização, quando as toxinas são reconhecidas por receptores caderina e ativam mecanismos de morte celular envolvendo canais de  $Mg^{+2}$ , PS-1 parece ativar a apoptose com a elevação das concentrações de  $Ca^{+2}$  intracelular. Em outras palavras, apesar das diferenças de cada célula em questão, processos celulares muito semelhantes estão determinando a morte de células suscetíveis do trato digestivo de invertebrados e células cancerígenas de vertebrados.

Sabendo dos mecanismos distintos que as parasporinas atuam com formação de poros ou induzindo a apoptose, cresce o interesse no desenvolvimento de micro-organismo que produzem simultaneamente duas ou mais tipos de parasporinas. Tal resultado já foi obtido por OKUMURA et al. (2013), que clonou o gene da PS-2 e inseriu em um plasmídeo e adicionou a bactérias que naturalmente produzia a PS-4. Testes com *E. coli* comprovaram a existência do gene no plasmídeo, que agora expressava simultaneamente.

Apesar do mecanismo de ação envolvendo a ação citotóxica das parasporinas ainda não estar completamente desvendado, observa-se o crescente interesse na aplicação dessas toxinas em um possível tratamento, haja vista a carências de novas substâncias anti-câncer. WONG et al. (2008) avaliaram a ocorrência de competição entre sítios ativos entre as parasporinas e os medicamentos comerciais anti-câncer. Analisando os sítios de ligação através de marcação com biotina em microscopia confocal, os autores revelaram a existência de poucos sítios em comum, atestando uma baixa competição (< 30%), não interferindo significativamente. Esse resultado demonstrou que as parasporinas de Bt podem ser uma ferramenta nova no tratamento da células cancerígenas, possibilitando ser usadas na terapêutica sem interferir no tratamento atualmente existente.

É inegável o potencial das parasporinas no desenvolvimento de novas substâncias anti-carcinogênicas, contudo, é importante ressaltar que a maioria dos resultados obtidos foram realizados *in vitro*, com a simulação do que ocorreria no sistema biológico. Em um dos poucos estudos disponíveis, EL-HAG & SAFTI (2011) testaram a cepa *B. thuringiensis* var. *dakota* no combate de células cancerígenas em camundongos. Os autores observaram um aumento significativo na sobrevivência dos roedores tratados em relação ao grupo controle. Da mesma forma, o número de metástases diminuiu, desaparecendo até em alguns casos, segundo os autores. Atribuiu-se ao aumento do tempo de sobrevivência por maior resistência aos tumores pelos camundongos tratados. Tais resultados apontam para o potencial das parasporinas do *B. thuringiensis* como matéria-prima para novos possíveis medicamentos de combate ao câncer.

#### 4. CONCLUSÃO

- Os mecanismo de citotoxicidade das proteínas Cry sobre o trato digestivo de invertebrados podem envolver a formação de poros com desequilíbrio osmótico e/ou com o estímulo da apoptose.
- A resistência ao Bt é originada por falhas na recepção das toxinas, seja por alteração dos receptores caderina, formação de transportadores de membrana e alteração na regulação da síntese dos receptores.
- A produção de quitinases pelo Bt é uma importante variável na eficiência dos bioinseticidas produzidos pela bactéria, atuando de maneira sinérgica às toxinas Cry e aumentando a eficiência das formulações.
- As parasporinas podem produzir um efeito citotóxico sobre determinados tipo de células cancerígenas produzindo poros ou estimulando a apoptose, semelhante ao que ocorre nas células dos invertebrados suscetíveis.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE Y, SHIMADA H, KITADA S. (2008). Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with Anti-Tumour activity. J Biochem-Tokio, 143, 269-275.

AKIBA T, ABE Y, KITADA S, KUSAKA Y, ITO A, ICHIMATSU T, HARATA K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That

Recognizes Cancer Cells. *J Mol Biol*, 386, 121-133.

BAXTER SW, BADENES-PÉREZ FR, MORRISON A, VOGEL H, CRICKMORE N, KAIN W, JIGGINS CD. (2011). Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189, 675-679.

BAXTER SW, ZHAO JZ, GAHAN LJ, SHELTON AM, TABASHNIK BE, HECKEL DG. (2005). Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. *Insect Mol Biol*, 14, 327-334.

BEEGLE CC, YAMAMOTO T (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can Entomol*, 124, 587-616.

BHATTACHARYA D, NAGPURE A, GUPTA RK. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol*, 27, 21-28.

BRAR SK, VERMA M, TYAGI RD, VALERO JR, SURAMPALLI RY. (2008). *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater and wastewater sludge—presence and characterization of chitinases. *Environ Technol*, 29, 161-170.

BRAVO A, GILL SS, SOBERÓN M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423–435.

BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL SS, SOBERÓN M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochem Molec*, 41, 423-431.

CARRIÈRE Y, DUTILLEUL P, ELLERS-KIRK C, PEDERSEN B, HALLER S, ANTILLA L, TABASHNIK BE. (2004). Sources, sinks, and the zone of influence of refuges for managing insect resistance to Bt crops. *Ecol Appl*, 14, 1615-1623.

CARRIÈRE Y, ELLERS-KIRK C, HARTFIELD K, LAROCQUE G, DEGAIN B, DUTILLEUL P, TABASHNIK BE. (2012). Large-scale, spatially-explicit test of the refuge strategy for delaying insecticide resistance. *P Natl Acad Sci-Biol*, 109, 775-780.

CHAIHARN M, LUMYONG S, HASAN N, PLIKOMOL A. (2013). Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production. *Ann Microbiol*, 1-8.

CHEN J, AIMANOVA K, FERNANDEZ L, BRAVO A, SOBERON M, GILL S. (2009). *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J*, 424, 191-200.

COOPER MA, CARROLL J, TRAVIS ER, WILLIAMS DH, ELLAR DJ. (1998). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem J*, 333, 677–683.

CÔTÉ JC. (2007). How early discoveries about *Bacillus thuringiensis* prejudiced subsequent research and use. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G, eds.

Biological Control – A Global Perspective. Wallingford: CAB International.

DAHIYA N, TEWARI R, HOONDAL GS. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 773-782.

DASH HR, MANGWANI N, DAS S. (2013). Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Environ Sci Pollut R*, 1-12.

DORSCH JA, CANDAS M, GRIKO NB, MAATY WSA, MIDBOE EG, VADLAMUDI RK, BULLA LA. (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of Bt-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1025–1036.

EL-HAG H, SAFHI M. (2011). Antimalignancy Activity of *Bacillus thuringiensis* Sero var Dakota (H15) *in vivo*. *World J. Medical Sci*, 6, 6-16.

ERNANDES S, BIANCHI VLD, MORAES IDO. (2012). Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*-doi: 10.4025/actascitechnol. v35i1. 13831. *Acta Sci-Technol*, 35, 11-18.

FABRICK J, OPPERT C, LORENZEN MD, MORRIS K, OPPERT B, JURAT-FUENTES JL. (2009). A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J Biol Chem*, 284, 18401–18410.

FARINÓS GP, DE LA POZA M, HERNÁNDEZ-CRESPO P, ORTEGO F, CASTAÑERA P. (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol Exp Appl*, 110, 23-30.

GAHAN LJ, PAUCHET Y, VOGEL H, HECKEL DG. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet*, 6, e1001248.

GÓMEZ I, SÁNCHEZ J, MIRANDA R, BRAVO A, SOBERÓN M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett*, 513, 242–246.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ CS, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ P, VAN RIE J, ESCRICHE B, FERRÉ J. (2012). Specific binding of radiolabeled Cry1Fa insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* to midgut sites in lepidopteran species. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4048-4050.

HUA G, JURAT-FUENTES JL, ADANG MJ. (2004). Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus*

*thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem Mol Biol*, 34, 193–202.

JIMÉNEZ-JUÁREZ N, MUÑOZ-GARAY C, GÓMEZ I, GILL SS, SOBERÓN M, BRAVO A. (2008). The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides*, 29, 318–323.

JURAT-FUENTES JL, ADANG MJ. (2006). The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry-US*, 45, 9688–9695.

KATAYAMA H, YOKOTA H, AKAO T, NAKAMURA O, OHBA M, MEKADA E, MIZUKI E. (2005). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem-Tokio*, 137, 17-25.

KITADA S, ABE Y, SHIMADA H, KUSAKA Y, MATSUO Y, KATAYAMA H, ITO A. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*, 281, 26350-26360.

KRANTHI KR, DHAWAD CS, NAIDU SR, MATE K, BEHERE GT, WADASKAR RM, KRANTHI S. (2006). Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Crop Prot*, 25, 119-124.

KROEGER I, DUQUESNE S, LIESS M. (2013). Crustacean biodiversity as an important factor for mosquito larval control. *J Vector Ecol*, 38, 390-400.

KRUGER M, RENSBURG JV, BERG JVD. (2011). Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environ Entomol*, 40, 477-483.

LEBEL G, VACHON V, PRÉFONTAINE G, GIRARD F, MASSON L, JUTEAU M, BAH A, LAROUCHE G, VINCENT C, LAPRADE R, SCHWARTZ JL. (2009). Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3842–3850.

LENORMAND T, RAYMOND M. (1998). Resistance management: the stable zone strategy. *Proc Biol Sci*, 265, 1985–1990.

LIU M, CAI QX, LIU HZ, ZHANG BH, YAN JP, YUAN ZM. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol*, 93, 374-379.

MAHON RJ, OLSEN KM, GARSIA KA, YOUNG SR. (2007). Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J Econ Entomol*, 100, 894-902.

MELO ALA, SANCHUKI CE, WOICIECHOWSK AL, THOMAZ-SOCCOL V,

SOCCOL CR. (2012). Utilização da cama de frango em meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner para o controle de *Aedes aegypti* Linnaeus. J Biotechnol Biodivers, 2, 1-6.

MILNER RJ (1994) History of *Bacillus thuringiensis*. Agric Ecosyst Environ, 49, 9-13.

MIZUKI E, OHBA M, AKAO T, YAMASHITA S, SAITOH H, PARK YS. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. J Appl Microbiol, 86, 477-486.

MORIN S, BIGGS RW, SISTERSON MS, SHRIVER L, ELLERS-KIRK C, HIGGINSON D, HOLLEY D, GAHAN LJ, HECKEL DG, CARRIÈRE Y, DENNEHY TJ, BROWN JK, TABASHNIK BE. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. P Natl Acad Sci-USA, 100, 5004–5009.

NAGAMATSU Y, OKAMURA S, SAITOU H, AKAO T, MIZUKI E. (2010). Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. Biosci Biotech Bioch, 74, 494-498.

OHBA M, MIZUKI E, UEMORI A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res, 29, 427-433.

OHBA M, YU M, AIZAWA K. (1988). Occurrence of noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. Syst Appl Microbiol, 11, 85–89.

OKUMURA S, ISHIKAWA T, SAITOH H, AKAO T, MIZUKI E. (2013). Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. Biotechnol Lett, 35, 1889-1894.

OKUMURA S, SAITOH H, ISHIKAWA T, INOUE K, MIZUKI E. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. Bba-Rev Biomembranes, 1808, 1476-1482.

PARDO-LÓPEZ L, MUÑOZ-GARAY C, PORTA H, RODRÍGUEZ-ALMAZÁN C, SOBERÓN M, BRAVO A. (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides, 30, 589–595.

PATIL SR, AMENA S, VIKAS A, RAHUL P, JAGADEESH K, PRAVEEN K. (2013). Utilization of Silkworm Litter and Pupal Waste-An Eco-Friendly Approach for Mass Production of *Bacillus thuringiensis*. Bioresource Technol, 131, 545-547.

PÉREZ C, MUÑOZ-GARAY C, PORTUGAL LC, SÁNCHEZ J, GILL SS, SOBERÓN M, BRAVO A. (2007). *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Cell Microbiol, 9, 2931–2937.

- PEREZ CJ, SHELTON AM. (1997). Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. J Econ Entomol, 90, 87-93.
- POORNIMA K, SELVANAYAGAM P, SHENBAGARATHAI R. (2010). Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. J Appl Microbiol, 109, 348-354.
- RAMIREZ-SUERO M, VALERIO-ALFARO G, BERNAL JS, RAMÍREZ-LEPE M. (2011). Synergistic effect of chitinases and *Bacillus thuringiensis israelensis* spore-toxin complex against *Aedes aegypti* larvae. Can Entomol, 143, 157-164.
- RAUSELL C, GARCÍA-ROBLES I, SÁNCHEZ J, MUÑOZ-GARAY C, MARTÍNEZ-RAMÍREZ AC, REAL MD, BRAVO A. (2004). Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Biochim Biophys Acta, 1660, 99-105.
- REYES-RAMÍREZ A, ESCUDERO-ABARCA BI, AGUILAR-USCANGA G, HAYWARD-JONES PM, BARBOZA-CORONA JE. (2004). Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. J Food Sci, 69(5), 131-134.
- ROH JY, CHOI JY, LI MS, JIN BR, JE YH. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J Microbiol Biotechnol, 17, 547-559.
- SAMPSON MN, GOODAY GW. (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiology, 144, 2189-2194.
- SANCHIS V. (2012) Genetic Improvement of Bt Strains and Development of Novel Biopesticides. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer Netherlands.
- SCHWARTZ JL, LAPRADE R. (2000). Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-LeRoux C, eds. Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishing, Norwell, MA.
- SCHWARTZ JL, LU YJ, SÖHNLEIN P, BROUSSEAU R, LAPRADE R, MASSON L, ADANG MJ. (1997). Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. FEBS Lett, 412, 270-276.
- SOBERÓN M, PARDO L, MUÑOZ-GARAY C, SÁNCHEZ J, GÓMEZ I, PORTA H, BRAVO A. (2010). Pore formation by Cry toxins. In: Anderluh G, Lakey JH, eds. Proteins: Membrane Binding and Pore Formation. Springer, New York.
- TABASHNIK BE, GASSMANN AJ, CROWDER DW, CARRIÈRE Y. (2008). Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. Nat Biotechnol, 26, 199-202.

- TABASHNIK BE, UNNITHAN GC, MASSON L, CROWDER DW, LI X, CARRIÈRE Y. (2009). Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *P Natl Acad Sci-Biol*, 106, 11889-11894.
- TAN F, ZHENG A, ZHU J, WANG L, LI S, DENG Q, TANG X. (2010). Rapid cloning, identification, and application of one novel crystal protein gene cry30Fa1 from *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 302, 46-51.
- TAN SY, CAYABYAB BF, ALCANTARA EP, HUANG F, HE K, NICKERSON KW, SIEGFRIED BD. (2013). Comparative binding of Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* toxins to brush border membrane proteins from *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) midgut tissue. *J Invertebr Pathol*, 114, 234-240.
- TIEWSIRI K, WANG P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *P Natl Acad Sci-Biol*, 108, 14037-14042.
- VACHON V, LAPRADE R, SCHWARTZ JL. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J Invertebr Pathol*, 111, 1-12.
- VU KD, YAN S, TYAGI RD, VALERO JR, SURAMPALLI RY. (2009). Induced production of chitinase to enhance entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* employing starch industry wastewater as a substrate. *Bioresource Technol*, 100, 5260-5269.
- WANG SL, LIN TY, YEN YH, LIAO HF, CHEN YJ. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res*, 341, 2507-2515.
- WIWAT C, THAITHANUN S, PANTUWATANA S, BHUMIRATANA A. (2000). Toxicity of Chitinase-Producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J Invertebr Pathol*, 76, 270-277.
- WONG SYR. (2009). A study on the cytotoxic effect of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on a leukaemic cell line (CEM-SS). Thesis submitted to the International Medical University, Malaysia.
- YAMASHITA S, KATAYAMA H, SAITOH H, AKAO T, PARK YS, MIZUKI E, ITO A. (2005). Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J Biochem-Tokio*, 138, 663-672.
- ZHANG X, CANDAS M, GRIKO NB, ROSE-YOUNG L, BULLA LA. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12, 1407-1416.



ZHUANG MB, OLTEAN DI, GÓMEZ I, PULLIKUTH AK, SOBERÓN M, BRAVO A, GILL SS. (2002). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. J Biol Chem, 277, 13863–13872.

## DISCUSSÃO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial do uso em controle biológico para cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, cujas abordagens de aplicação e produção enfocaram as condições encontradas no estado do Paraná. A produção local dos bioinseticidas é considerada por vários autores como sendo a mais adequada no controle biológico, garantindo a qualidade do produto e eliminando longos períodos de armazenamento, que colocam em risco sua eficiência (Bhumiratana 1987, Foda et al. 1993, Alves et al. 1997).

Alguns aspectos puderam ser observados ao longo do trabalho que corroboraram com a produção autônoma dos biopesticidas. Primeiramente a riqueza de estirpes de *Bacillus thuringiensis* isoladas no solo, que possibilitaram resultados preliminares satisfatórios no controle de invertebrados de interesse. A biodiversidade microbiana demonstra que cepas com potencial no controle biológico estão facilmente disponíveis no solo, dependendo apenas de técnicas simples de isolamento e estudo. Dessa forma, o controle biológico não dependeria de isolados exóticos de *B. thuringiensis*.

No estado do Paraná, os produtos derivados de Bt possuem um extenso campo de utilização e aplicabilidade. Na saúde pública, por exemplo, foi demonstrada a necessidade do desenvolvimento de estratégias de controle do *Aedes aegypti* por sua franca expansão e elevada incidência em algumas regiões. A produção de inseticidas biológicos de forma local e autônoma ajudaria nas campanhas de eliminação de vetores e, conseqüentemente, auxiliando na prevenção das epidemias de dengue, que se tornaram tão frequentes a cada ano. Seguindo o mesmo intuito, Lopes et al. (2010) relataram, em Londrina, o sucesso no desenvolvimento de um produto de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de *Aedes aegypti*. Os autores relatam uma eficiência do produto fermentado localmente similar aos produtos comerciais, além de um longo período de estabilidade no meio. O número elevado de casos de dengue no Estado indica que as campanhas de prevenção devem assumir múltiplas estratégias, através da mobilização dos cidadãos e aplicação de diferentes produtos de controle anti-larvário.

Outra aplicação dos bioinseticidas de Bt que merece destaque está no agronegócio. A agricultura e a pecuária ocupam um papel central na economia,

movimentando um extenso volume de capital na região sul, sendo o Estado um dos maiores produtores e exportadores de grãos do país. Além do aspecto econômico, a atividade agrícola está bastante associada ao aspecto humano da população, havendo o predomínio da agricultura familiar e de pequenas propriedades (Guilhotto et al. 2007). Nesse contexto, os bioinseticidas de *B. thuringiensis* são usados para o controle de pragas que causam perdas nas lavouras e prejuízos nas pastagens, porém, os preços elevados encarecem o valor dos insumos agrícolas, diminuindo o rendimento e a competitividade desses produtos. Possibilitar alternativas de menor custo através da produção local desses bioinseticidas traria benefícios aos produtores e consumidores das mercadorias produzidas. No presente trabalho, três isolados nativos de *B. thuringiensis* apresentaram resultados preliminares satisfatórios no controle de duas categorias de pragas agrícolas, nematóides e lepidópteros, sendo candidatos potenciais na formulação de um produto local com eficiência e baixo custo.

Um fator que favorece a produção local dos inseticidas biológicos é a riqueza de matérias-primas disponíveis para a fermentação do micro-organismo. Embora apresente a exclusiva capacidade de produzir proteínas de ação citotóxica, o *B. thuringiensis* não possui grandes exigências fisiológicas para o crescimento, sendo fontes de carbono e nitrogênio suficientes para sua produção em larga escala (Dulmage et al. 1990). Num Estado onde a produção agrícola tem destaque em volume e qualidade de produtos, uma grande variedade de fontes orgânicas está disponível como substrato a um baixo custo. Esse aproveitamento vem sendo realizado com sucesso nos últimos anos, com a utilização das mais variadas fontes disponíveis vegetais e animais, como o farelo de soja e a farinha de *Bombyx mori* (Melo et al. 2009, Ângelo et al. 2013). Nossos resultados reforçam essa constatação ao produzir um meio de cultivo usando com base a cama de frango, resíduo da indústria aviária gerada em grande volume, para produção de *B. thuringiensis*.

As vantagens do controle de pragas realizado por pesticidas de origem biológica são muito valorizadas numa economia globalizada, que prioriza alimentos com baixas concentrações de resíduos químicos (Lima & Marques, 2001). Dessa forma, os bioinseticidas já ocupam lugares de destaque nas prateleiras de produtos para agricultura, invariavelmente produzidos por grandes empresas de insumos agrícolas. Contudo, apesar da eficiência comprovada e fácil disponibilidade nas lojas especializadas, as pesquisas envolvendo a produção local dos bioinseticidas ainda

ocorrem num ritmo acelerado devido ao elevado custo dessas formulações. Ao constatar-se que esses micro-organismos podem ser encontrados facilmente no ambiente e multiplicam-se nas mais variadas fontes orgânicas, os grandes produtores agrícolas passaram a desenvolver localmente seus bioinseticidas ao invés de adquiri-los a preços elevados. Como consequência, um número crescente de trabalhos relatando o sucesso de meios de cultivo alternativos em fermentações com *B. thuringiensis* tem sido feitos ano após ano (Devi et al. 2005, El-Bendary et al. 2006, Ghribi et al. 2007, Prabakaran et al. 2008, Soccol et al. 2009, Hasan et al. 2010, Paul et al. 2011, Ernandes et al. 2012). Tal fato reafirma que o caminho dos inseticidas biológicos é a produção local, adaptada a cada país, com as características particulares da região e inserida em cada realidade. Da mesma forma, o Paraná, assim como o Brasil, também deve adotar essa estratégia, pois dispõe de recursos naturais e tecnologia para produzir bioinseticidas com qualidade e a um custo acessível às autoridades de saúde ou produtores agrícolas.

Além do uso no controle de pragas agrícolas e no combate a vetores, as potencialidades do micro-organismo parecem longe de se esgotar. Como levantado no último capítulo da tese, a produção de quitinases e cristais proteicos que desencadeiam citotoxicidade em células alteradas de alguns tipos de câncer indicam que as pesquisas com *B. thuringiensis* ainda têm muito a evoluir, trazendo benefícios aos mais distintos ramos da ciência.

## REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES LFA, ALVES SB & CAPALBO DMF (1997) Seleção de matéria prima para a elaboração de meio de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. An. Soc. Entomol. Bras. 26(2), 379-382.

ANGELO EA, VILAS-BOAS GT, DOS SANTOS CA, LOPES J & ARANTES OMN (2013) Desenvolvimento de um meio de cultura de baixo custo para *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 33(2), 161-170.

BHUMIRATANA A (1987). Production and utilization of *Bacillus thuringiensis* for controlling insect pests and vectors in Thailand. Asia-Pacific Biotechnology Congress, Manila (Philippines), 11-14 Oct 1986. PSMI.

DEVI PS, RAVINDER T & JAIDEV C (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. Journal of invertebrate pathology, 88(2), 163-168.

DULMAGE HT, YOUSTEN AA, SINGER S, LACEY LA & LAWRENCE A (1990) Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. WHO, Geneva.

EL-BENDARY MA (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of basic microbiology, 46(2), 158-170.

ERNANDES S, BIANCHI VLD & MORAES IDO (2012). Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. Acta Scientiarum. Technology, 35(1), 11-18.

FODA MS, HS SALAMA & FADEL M (1993) Local production of *Bacillus thuringiensis* in Egypt. 149-165. In Salama HS, Morris ON & Rached E (eds) The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries. Cairo, Nature Research Centre, 339.

GUILHOTO JJM, ICHIHARA SM, SILVEIRA SV, DINIZ BPC, AZZONI CR & MOREIRA GRC (2007) A importância da agricultura familiar no Brasil e em seus Estados. In: 35º Anais do Encontro Nacional de Economia; 2007 dez 4-7; Recife, Brasil [Internet]. Recife: ANPEC.

GHRIBI D, ZOUARI N, TRIGUI W & JAOUA S (2007) Use of sea water as salts source in starch-and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochemistry, 42(3), 374-378.

HASAN MH, AKTER A, ILIAS M, KHAN SN & HOQ MM (2010) Growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* isolates in media based on mustard-seed meal. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 27(2), 51-55.

LIMA DM & MARQUES PV (2001). *Produtos orgânicos, um mercado em expansão*. Recife: Sober.

LOPES JA, ARANTES OMN & CENCI MA (2010) Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1109-1113.

MELO ALA, SOCCOL CR, THOMAZ-SOCCOL V & NOGUEIRA JR MS (2009) Evaluation of *Bacillus sphaericus* bioinsecticide produced with white soybean meal as culture medium for the control of *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus*. *Cadernos de Saude Publica*, 25(3), 563-569.

PAUL B, PAUL S & KHAN MA (2011) A potential economical substrate for large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* for caterpillar control. *Biocontrol Science and Technology*, 21(11), 1363-1368.

PRABAKARAN G, HOTI SL, MANONMANI AM & BALARAMAN K (2008). Coconut water as a cheap source for the production of  $\delta$  endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. *Acta tropica*, 105(1), 35-38.

SOCCOL CR, POLLOM TE, FENDRICH RC, PROCHMANN FA, MOHAN R, BLASKOWSKI MMM, ... & SOCCOL VT (2009). Development of a Low Cost Bioprocess for Endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Intended for Biological Control of *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPE), 121-130.

## CONCLUSÕES

### Capítulo 1

- No período 2009-2011, a incidência da dengue no estado do Paraná teve pico no período epidêmico de 2009-2010, alcançando 308,8 casos / 100.000 habitantes, configurando área de alta incidência para a doença.
- As formas graves da doença prevaleceram no período de 2010-2011, com 128 casos de dengue com complicações e 105 casos de febre hemorrágica do dengue.
- O número de casos de dengue apresentou oscilações e a distribuição da doença no Paraná não foi homogênea, sofrendo a influência dos estados vizinhos além das características particulares de cada região.

### Capítulo 2

- A cepa BR-01 apresentou a maior toxicidade contra *Aedes aegypti*, atingindo mortalidade de 96,7% e valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 11,76  $\mu\text{L.L}^{-1}$  e 21,61  $\mu\text{L.L}^{-1}$ .
- A cepa BR-09 apresentou a maior toxicidade contra *Duponchelia fovealis*, atingindo 79,2% de mortalidade e  $CL_{50}$  de 13,74  $\mu\text{L}$ .
- As cepas BR-04 e BR-12 apresentaram as maiores toxicidades contra *Panagrellus redivivus*, atingindo mortalidades de 95% e 70%, respectivamente, além de  $CL_{50}$  de 37,30  $\mu\text{L.L}^{-1}$  e 42,77  $\mu\text{L.L}^{-1}$ .
- As amplificações aleatórias por RAPD demonstraram a diversidade genética dos isolados nativos de *B. thuringiensis*, com índices de similaridade reduzidos entre si e a linhagem referência.
- A diversidade genética e funcional demonstram o grande potencial verificado nos isolados nativos de *B. thuringiensis*, cujas aplicações podem abranger variados ramos do controle biológico, desde o controle de vetores ao combate a pragas agrícolas.

### Capítulo 3

- A cama de frango produziu o melhor resultado entre as matérias-primas testadas, propiciando mortalidade de 100%, 65% e 20% de larvas de *A. aegypti* nas concentrações de 20, 10 e 5  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

- A composição química da cama de frango foi determinante para o resultado, com elevados teores de fonte de carbono, principalmente sob a forma de fibras (próximo a 40%) e reduzida quantidade de proteínas, numa proporção de C/N de 10 : 1.

#### **Capítulo 4**

- Os mecanismo de citotoxicidade das proteínas Cry sobre o trato digestivo de invertebrados podem envolver a formação de poros com desequilíbrio osmótico e/ou com o estímulo da apoptose.
- A resistência ao Bt é originada por falhas na recepção das toxinas, seja por alteração dos receptores caderina, formação de transportadores de membrana e alteração na regulação da síntese dos receptores.
- A produção de quitinases pelo Bt é uma importante variável na eficiência dos bioinseticidas produzidos pela bactéria, atuando de maneira sinérgica às toxinas Cry e aumentando a eficiência das formulações.
- As parasporinas podem produzir um efeito citotóxico sobre determinados tipos de células cancerígenas produzindo poros ou estimulando a apoptose, semelhante ao que ocorre nas células dos invertebrados suscetíveis.